

**UNTERSUCHUNGEN
ZUR BIOSYNTHESE DES
KOLLAGENS**

KURT RAISCH

1976

UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOSYNTHESE DES KOLLAGENS

als

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

ERLANGUNG DES DOKTORGRADES

des

FACHBEREICHS BIOLOGIE

der

LUDWIG - MAXIMILIANS - UNIVERSITÄT

vorgelegt von

Kurt Raisch

aus

München

1976



1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Klingmüller

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Cleve

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Dezember 1976

Meiner Frau

Die vorliegende Arbeit wurde durchgeführt

am Max-Planck - Institut für Biochemie

in Martinsried bei München

unter der Leitung von Prof. Dr. K. Kühn

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN	X
1. EINLEITUNG	1
2. AUFGABENSTELLUNG	13
3. ERGEBNISSE	17
3.1. EINFLUSS VON α, α' -DIPYRIDYL AUF DIE PROTEINSYNTHESE UND DIE HYDROXYLIERUNG	17
3.2. REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON PROKOLLAGEN	23
3.3. VERSUCHE ZUR FUNKTION DES PROKOLLAGENS BEI DER REGISTERFINDUNG	39
3.4. KETTENAUSWAHL UND STABILITÄT DER TRIPELHELIX UNTER DEM EINFLUSS VON α, α' -DIPYRIDYL	46
3.5. GLYCOSYLIERUNG	55
3.6. SEKRETION	59
4. DISKUSSION	63
5. ZUSAMMENFASSUNG	76

6.	MATERIAL UND METHODEN	79
6.1.	MATERIALIEN	79
6.2.	GEWINNUNG VON RADIOAKTIV MARKIERTEN SYNTHESPRODUKTEN	82
6.2.1.	<i>Inkubation</i>	82
6.2.2.	<i>Aufarbeitung der Gewebeeextrakte im Neutralen</i>	83
6.2.3.	<i>Aufarbeitung der Inkubationsmedien im Neutralen</i>	83
6.3.	GEWINNUNG VON LATHYRITISCHEM RATTENHAUTKOLLAGEN	84
6.4.	CHROMATOGRAPHIE	85
6.4.1.	<i>Chromatographie an CMC</i>	85
6.4.2.	<i>Chromatographie an Agarose Ag 1.5</i>	85
6.5.	GEL - ELEKTROPHORESE IN SDS	85
6.6.	BESTIMMUNG DES HYDROXYLIERUNGSGRADES	87
6.6.1.	<i>Peptidylprolylhydroxylase - Test</i>	87
6.6.2.	<i>Aminosäureanalyse</i>	88
6.7	PEPSINBEHANDLUNG	89
6.8	DARSTELLUNG DER SLS IM EM	89
7.	LITERATURVERZEICHNIS	90
	ANHANG	97

Abkürzungen

α	monomere Polypeptidketten des Kollagens
α KGS	α Ketoglutarensäure
β	Dimer aus zwei α -Ketten
β 12	Dimer aus α 1- und α 2-Ketten
γ	Trimer aus drei α -Ketten
BAPN	β -Aminopropionitril
CB	Kollagenpeptid, erhalten durch Behandlung mit CNBr
CMC	Carboxymethyl-Cellulose (Trägermaterial, s.6.4.1.)
Col	(Pro-)Kollagenpeptid nach Kollagenasespaltung
CPM	Impulse / Min.
DEAE	Diäthylaminoäthyl
DS	dermatosparaktisch
DTT	Dithioerythrit (Dithiothreitol)
EDS	Ehlers-Danlos Syndrom
EDTA	Äthylendinitrilotetraessigsäure-Dinatriumsalz
EM	Elektronenmikroskop
HAc	Essigsäure
JAc	Jodacetamid
M	Molar
p α	Zwischenstufe bei Umwandlung von pro α - zu α -Ketten
pro α	1. Translationsprodukt einer α -Kette
SDS	Dodecylsulfat-Natriumsalz
SLS	Segment-long-spacing-Kristallit
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(Hydroxymethyl)aminomethan
UPM	Umdrehungen pro Min.

1. EINLEITUNG

In der frühen Embryonalentwicklung breitet sich das Mesenchym als zukünftiges Bindegewebe zwischen den drei Keimblättern aus. Es hat Teil am Aufbau aller Organe und bildet das Ausgangsmaterial einerseits für die Zellen der Blutbildung und der körpereigenen Abwehr, andererseits für die Zellen des Fettgewebes und des Stützgewebes. Im Interzellularraum des Stützgewebes (=Matrix) finden sich amorphe Grundsubstanzen und lichtmikroskopisch erkennbare Bindegewebsfasern. Diese stellen den überwiegenden Anteil der Bindegewebsproteine dar.

Die silberweiß glänzenden Kollagenfasern, aufgebaut aus Mikrofibrillen und Fibrillen, können in Sehnen, Muskelbinden (Fascien), in der Lederhaut, im gefäßführenden Bindegewebe, im Knorpel und Knochen nachgewiesen werden. Unter dem Elektronenmikroskop (s. Abb. 1) erkennt man nach Anfärbung der polaren Gruppen mit Uranylazetat und Phosphorwolframsäure (positive Anfärbung) eine Querstreifung mit einer Identitätsperiode von $670 \text{ \AA}$ ^(1,2). Dieses Querstreifungsmuster entsteht durch Überlagerung der Ladungsmuster der Einzelmoleküle, welche sich in der Fibrille um $1/4$ in ihrer Länge versetzt seitlich aneinander lagern ⁽¹⁻³⁾.

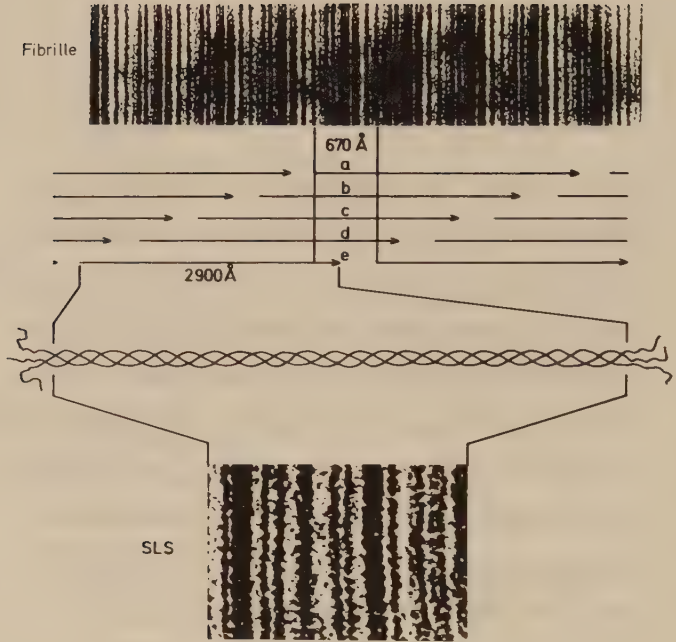


Abbildung 1:

Oberer Teil: Mikrofibrille.

Elektronenmikroskopische Aufnahme säurelöslichen Kalbshautkollagens; die positive Anfärbung mit Uranylazetat und Phosphorwolframsäure läßt ein charakteristisches Querstreifungsmuster mit einer Identitätsperiode von $670 \text{ \AA}$ erkennen. Dazu die schematische Anordnung der Moleküle innerhalb der Fibrille.

Unterer Teil: Kollagenmolekül.

Schematische Anordnung der drei α -Ketten innerhalb des Moleküls mit einem tripelhelikalen Bereich von $2\,900 \text{ \AA}$ sowie den terminalen nicht tripelhelikalen Telozeptiden. Dazu eine elektronenmikroskopische Aufnahme des Segment-long-spacing-Kristalliten (SLS) aus säurelöslichem Kalbshautkollagen nach positiver Anfärbung mit dem unperiodischen Querstreifungsmuster.

Monomere Kollagenmoleküle, in verdünnter Essigsäure gelöst, ordnen sich bei Zugabe von ATP mit den Enden abschneidend parallel nebeneinander in *segment-long-spacing*-Kristalliten (SLS) an ^(2,3). Nach negativer Anfärbung kann man unter dem EM die Länge der SLS und damit die Moleküllänge genau abmessen. Bei positiver Anfärbung wird im SLS ein unperiodisches Querstreifungsmuster erkennbar, welches die Verteilung polarer und apolarer Aminosäuren entlang des Kollagenmoleküls widerspiegelt (s. Abb. 1).

Das Einzelmolekül besitzt mit einem Molekulargewicht von 300 000 Daltons die Gestalt eines steifen Stäbchens mit einem Durchmesser von 14 Å und einer Länge von 2 900 Å ⁽¹⁻³⁾. Es besteht aus drei Polypeptidketten, den α -Ketten, welche eine gemeinsame Tripelhelix bilden (rechts drehend) (s. Abb. 1). Jede dieser α -Ketten enthält über 1 000 Aminosäuren, und bildet für sich eine gestreckte Helix (links drehend). Auffallend ist das Vorkommen der seltenen Aminosäuren Hydroxylysin und Hydroxyprolin, ein ungewöhnlicher Gehalt an Iminosäuren (1/5 aller Aminosäuren sind Prolin oder Hydroxyprolin), sowie der charakteristisch hohe Gehalt an Glycin (1/3 aller Aminosäuren). Die durch das regelmäßige Auftreten des Glycins innerhalb der Sequenz definierten Aminosäuretriplets -Gly-X-Y- enthalten Prolin besonders in X-Stellung, Hydroxyprolin fast ausschließlich in Y-Stellung ⁽¹⁻⁵⁾.

Tabelle 1 : Kollagenpolymorphismus (nach²).

Molekülzusammensetzungen, hauptsächliches Vorkommen und einige charakteristische Merkmale.

Kollagen- typ	Vorkommen	Molekülzu- sammensetzung	3'Hyp	4'Hyp	Pro ⁺	Hyl/Lys ⁺	Cys ⁺	Try ⁺	Kohlen- hydrat* Sequenz bekannt?
I	Haut, Sehnen, Knochen	$[\alpha 1(I)]_2$	1	82	/135	7/30	0	0	0,5
II	Knorpel	$[\alpha 1(II)]_3$	2	91	/129	23/15	0	0	10
III	fötale Ge- webe, Haut, Gefäße, Reti- kulumfasern	$[\alpha 1(III)]_3$	0	127	/109	5/30	2	?	0,5
IV	Glaskörper, Glomeruli, Basalmembran	$[\alpha 1(IV)]_3$	11	130	/ 61	45/10	8	?	12
									-

+) Aminosäurereste/1000Reste; *) Gehalt an Galaktose- und Glucoseresen in Gewicht-%.

Kollagen tritt in genetisch determinierten Varianten auf (Polymorphie) ^(2.6.7), deren Primärstruktur weitgehende Homologie aufweist ^(2.5) und deren gewebespezifische Verteilung (s.Tab.1) einen funktionalen Zusammenhang erwarten läßt. Der überwiegende Teil des Haut-, Sehnen- und Knorpelkollagen besteht aus Typ I Kollagen ^(2.5.9). Typ II Kollagen oder Knorpelkollagen kommt im hyalinen Knorpel vor ^(2.6.7.10). Typ III Kollagen tritt in den Gefäßen und im fötalen Bindegewebe auf, in geringeren Mengen auch in der adulten Haut ^(2.11). Typ IV Kollagen stellt den kollagenen Anteil der Basalmembran dar.

Als Besonderheit besteht das Molekül des Typ I Kollagen aus genetisch unterschiedlichen α -Ketten: zwei $\alpha 1(I)$ - und eine $\alpha 2$ -Kette bilden das $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2$ -Molekül (s.Tab.1). Die übrigen bisher bekannt gewordenen Kollagentypen bauen sich dagegen aus drei identischen α -Ketten auf und besitzen die allgemeine Molekülzusammensetzung $[\alpha 1(n)]_3$.

Wie die meisten Proteine, die aus der Zelle ausgeschleust werden und ihre eigentliche physiologische Funktion extrazellulär erfüllen ^(12.13), z.B. Verdauungsenzyme, wird Kollagen in einer Vorstufe synthetisiert (s.Abb.2) ^(8.14-30). Diese durchläuft außerdem eine Reihe posttranslationaler Modifikationen, welche weiter unten in Abbildung 3 bespro-

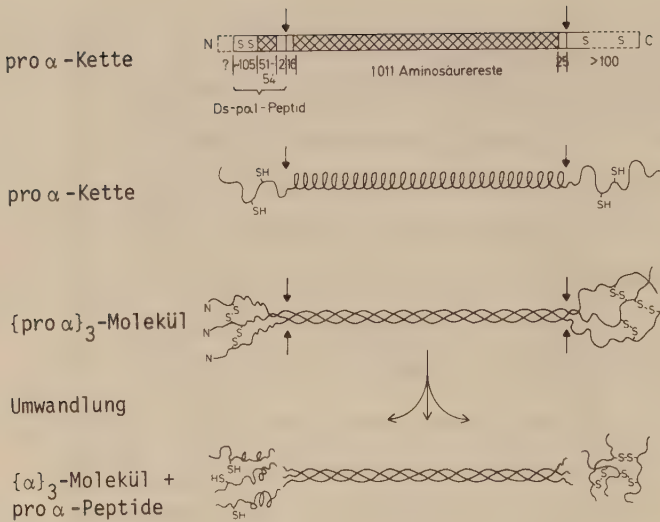


Abbildung 2:

Prokollagen, pro α -Kette, Kollagen und Prokollagenpeptide:

oben: Schema der Verteilung tripelhelikaler (XXXXXX) und nicht helikaler (====) Sequenzbereiche, soweit sie aus der DS-p $\alpha 1$ (I)-Kette bekannt wurden.

N: Aminotermminus

C: Carboxyterminus

S: Cysteinreste

↓: Spaltstellen der Prokollagenpeptidase(n) bei der Umwandlung des Prokollagens zum Kollagen.

chen werden. Die zunächst auftretenden Polypeptidketten, die pro α -Ketten, besitzen aufgrund zusätzlicher Peptide sowohl am Aminoterminal (^{16,25,27,30}) als auch am Carboxyterminal (^{29,30}) ein Molekulargewicht von mindestens 150 000 Daltons. Im Gegensatz zu den tripelhelikalen Bereichen weisen die Extensionen nicht die für Kollagen typische Sequenz auf, die auf S.3 beschrieben wurde, so daß ihnen die Bildung einer Tripelhelix größtenteils nicht möglich sein dürfte (s.Abb.2). Damit sind diese Bereiche proteolytischer Aktivität genauso ungeschützt ausgesetzt wie die Telo-peptide und andere Proteine (²⁸⁻³¹). Den Prokollagenpeptiden werden eine Reihe spezifischer Funktionen zugeschrieben:

- 1) Die Steuerung der Zusammenlagerung dreier pro α -Ketten im richtigen "Register" als Voraussetzung für die fehlerfreie Ausbildung der Tripelhelix (^{16,32,33}). Diese Annahme konnte bisher nicht experimentell belegt werden.
- 2) Die Auswahl der Ketten vor der Tripelhelixbildung. So müssen in Typ I Kollagen zwei $\alpha 1$ - und eine $\alpha 2$ -Kette zusammengeführt werden. Ein ähnlicher Selektionsmechanismus ist erforderlich, wenn verschiedene Kollagentypen gleichzeitig innerhalb einer Zelle synthetisiert werden (³⁴). Auch für diese Vermutung gibt es bisher keine experimentellen Hinweise.

- 3) Die Erhöhung der Löslichkeit des Moleküls ⁽¹⁷⁾ als Voraussetzung einer intrazellulären Transportform.
- 4) Die Regulation der Fibrillenbildung über die spezifische Abspaltung der terminalen Peptide. Im Gegensatz zu Kollagen kann sich Prokollagen nur schlecht in eine Fibrille einordnen ^(16,35,36).

Nach der Synthese an Polysomen wird die Bildung von Kollagenmolekülen und die extrazelluläre Zusammenlagerung zu mechanisch stabilen unlöslichen Fibrillen von einer Anzahl spezifischer Enzyme geregelt (s. Abb. 3) ^(6,7,14,18,37). Im Anschluß an die Translation, wahrscheinlich sogar noch während derselben, werden bestimmte peptidgebundene Prolyl- und Lysylreste hydroxyliert ^(15,17). Hydroxyprolin ist eine notwendige Voraussetzung für die Stabilität der Tripelhelix, da es sich herausgestellt hat, daß unhydroxyliertes Kollagen bei einer Körpertemperatur über etwa 18°C nicht als Tripelhelix bestehen kann ^(17,23,38). Von Hydroxylysin wurden zwei Funktionen bekannt: zum einen stellt es eine wesentliche Komponente der für Kollagen typischen Quervernetzungen in der Fibrille ⁽³⁹⁻⁴¹⁾ und zum anderen können auf bestimmte Hydroxyllysylreste Zuckerreste übertragen werden: Auf die in einem ersten Schritt gebundene Galaktose kann

in einem zweiten Glucose übertragen werden (^{3,7, 42}). Obgleich sich die verschiedenen Kollagentypen im Ausmaß der Glycosylierung erheblich unterscheiden (⁴³), konnte noch kein eindeutiger Bezug zu physiologischen Funktionen hergestellt werden.

Das so fertiggestellte Prokollagen kann nun aus der Zelle ausgeschleust werden. In Verbindung mit der Sekretion geht

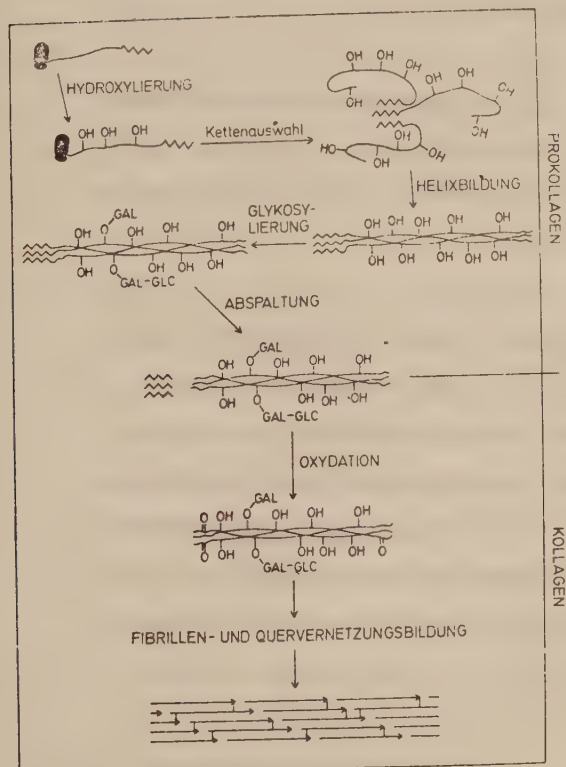


Abbildung 3:

Schema der posttranslationalen Modifikationen in der Kollagenbiosynthese. Die Allylbildung (Oxidation der ϵ -Aminogruppe von Lysin bzw. Hydroxylysin) wurde zur Vereinfachung außerhalb der Fibrille gezeichnet.

es durch eine spezifische Abspaltung der Prokollagenpeptide in das Kollagenmolekül über. Es ist anzunehmen, daß die Umwandlung des Prokollagens zum Kollagen mindestens in zwei Schritten abläuft. Es ist nicht bekannt, ob für diese Schritte ein oder mehrere Enzyme nötig sind. Im Anschluß an die Umwandlung lagern sich die Moleküle autonom zu Fibrillen zusammen (s. Abb. 3) ⁽²⁾. Nach der Zusammenlagerung werden Hydroxylysylreste innerhalb der endständigen Telopeptide durch die Lysyloxidase zu Aldehyden oxidiert, welche dann spontan Quervernetzungen eingehen können ^(39.40).

Die Untersuchungen der posttranslationalen Modifikationen wurden erleichtert durch das Vorkommen kongenitaler Bindegewebssyndrome, in denen bestimmte Enzyme des Kollagenstoffwechsels nicht aktiv sind ^(44.45).

So wurde im Ehlers-Danlos-Syndrom vom Typ VI (EDS VI) eine Peptidyllysylhydroxylasedefizienz gefunden ^(41.44.45). Die bei diesem Syndrom besonders auffallende Löslichkeit des Kollagens findet ihre Erklärung im Fehlen des Hydroxylysyls als einer wesentlichen Quervernetzungs Komponente. In einem anderen Bindegewebssyndrom, dem EDS V wurde eine Lysyloxidasedefizienz wahrscheinlich gemacht, was ebenfalls eine Verminderung der Quervernetzungen zur Folge

hat. Als weitere genetische Anomalie wurde eine unvollständige Abspaltung der aminoterminalen Prokollagenpeptide als Dermatosparaxie (DS) bei Kälbern ^(16, 35, 36, 44) und bei Schafen beschrieben. Beim Menschen wurde eine unvollständige Umwandlung im EDS VII gefunden ⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾. Aufgrund einer sterischen Hinderung durch die zusätzlichen Peptidsequenzen können sich die Kollagenmoleküle nicht zu intakten Fibrillen zusammenlagern ^(16, 35, 36). Die Anreicherung dieses Prokollagens in Geweben dermatosparaktischer Tiere wurde dazu benutzt, die Prokollagenpeptide in so großen Mengen zu isolieren, daß ihre Primärstruktur untersucht werden konnte. Prokollagen auf andere Weise in Zell- oder Organkultur anzureichern ^(16, 19) ist nur begrenzt möglich, da es sich hierbei um ein kurzlebiges Zwischenprodukt handelt, welches lange übersehen wurde.

Eine zweite Möglichkeit, die posttranslationalen Modifikationen zu untersuchen, besteht darin, bestimmte Enzyme durch exogene Faktoren zu blockieren. So kann die Lysyloxidase, welche die funktionellen Gruppen der Quervernetzung bildet, durch β -Aminopropionitril (BAPN) irreversibel inhibiert werden (=Lathyrismus) ^(37, 44, 47). Durch D-Penicillamin kann die Quervernetzungsreaktion ebenfalls blockiert werden, da es wie viele andere Thiole reversibel mit den

Allylresten reagieren kann (37.44). Ein Inhibitor, welcher mehrere Funktionen gleichzeitig stört, ist der Chelatbildner α, α' -Dipyridyl, nämlich die beiden Peptidylhydroxylasen und den Übergang vom Prokollagen zum Kollagen (17. MÜLLER *et al.* 21. 22-24). Die Hydroxylasen benötigen als Cofaktoren neben α KGS, Ascorbinsäure und O_2 auch Fe^{++} (17. 21. 37. 48-50), welches durch den Chelatbildner gebunden wird. Auch durch Mangel an Sauerstoff konnte unterhydroxyliertes Kollagen angereichert werden (LANG-NESS und UDENFRIEND 21. 49).

Während BAPN und D-Penicillamin auf den allgemeinen Stoffwechsel der Zelle nur einen geringen Einfluß haben, wirkt α, α' -Dipyridyl in höheren Dosierungen toxisch. Dies erklärt sich dadurch, daß viele Enzyme in der Zelle Schwermetalle benötigen.

2. AUFGABENSTELLUNG

So wie die Verwendung von α, α' -Dipyridyl zur Anreicherung unhydroxylierten Kollagens verwendet würde und damit die Bedeutung des Hydroxyprolins für die Stabilität der Tripelhelix erkannt werden konnte ^(17.23), sollte die Blockierung der Umwandlungsreaktion dazu benutzt werden, die physiologischen Funktionen des Prokollagens aufzuklären. Besonderes Augenmerk sollte dabei den Schritten vor der Tripelhelixbildung sowie der Umwandlung des Prokollagens zum Kollagen gelten.

Voraussetzung bei der Verwendung von α, α' -Dipyridyl bei der Anreicherung einer Vorstufe des Kollagens war jedoch, dieses Prokollagen näher zu charakterisieren und den komplexen Einfluß von α, α' -Dipyridyl auf andere Modifikationsschritte der Kollagenbiosynthese abzugrenzen. Dazu gehörte auch, die Auswirkungen der Blockierung der Prolinhydroxylierung auf die Stabilität der Tripelhelix in Typ I und II Kollagen zu analysieren.

Als System sollte die Organkultur von Calvaria und Sterna embryonaler Hühnchen benutzt werden. Die beiden Gewebe sollten parallel untersucht werden, da der Knochen Typ I Kollagen und der Knorpel Typ II Kollagen synthetisieren und so

nebeneinander die Wirkung in zwei ähnlichen Systemen studiert werden konnte. Gegenüber der Kultur isolierter Zellen wurden intakte Gewebestücke vorgezogen, um sicherzustellen, daß die noch unbekannten Wechselwirkungen zwischen den Zellen und ihrer ursprünglichen Matrix erhalten blieben. Es wurde nämlich bekannt, daß isolierte Chondrozyten nach kurzer Zeit in der Zellkultur anstatt Typ II Typ I Kollagen synthetisieren⁽⁵¹⁾.

Die Untersuchung gliederte sich in folgende Teilaspekte:

- 1) Als Voraussetzung der Experimente sollten Bedingungen ausgearbeitet werden, unter denen einerseits die spezifische Wirkung des α, α' -Dipyridyls auf die Hydroxylierung vollständig gewährleistet wurde, andererseits aber noch ein Mindestmaß einer Kollagensynthese verfolgt werden konnte. Dazu sollte zunächst der toxische Einfluß von α, α' -Dipyridyl auf die Zelle quantifiziert werden, wobei als Maß die Proteinbiosynthese gelten sollte. Anschließend sollte der Hydroxylierungsgrad unter diesen Bedingungen ermittelt werden.
- 2) Als eine weitere Vorbedingung für die Untersuchungen sollte das in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl synthetisierte Prokollagen gereinigt und charakterisiert werden. Zunächst mußten aber Extraktionsbedingungen ausgearbeitet

werden, unter denen ein proteolytischer Abbau der nicht tripelhelikalen Prokollagenpeptide weitgehend vermieden wurde. Als Erfolgskontrolle einerseits der Aufarbeitungsprozedur, andererseits der Wirkung von α, α' -Dipyridyl sollten die Ergebnisse der anschließenden Charakterisierung mit den geforderten oder bereits bekannten Prokollageneigenschaften verglichen werden. Dabei sollte auch bewiesen werden, ob das untersuchte Material tatsächlich einen Vorläufer des Kollagens darstellte. Dazu gehörte die Analyse der Umwandlung mit der Abspaltung der Prokollagenpeptide. Eine weitere wichtige Aufgabe bestand darin, festzustellen, ob das gewonnene Prokollagen aminoterminal- und carboxyterminale Peptidsequenzen enthielt oder nur *eine* der Extensionen. Außerdem sollte der Bereich der intramolekularen Disulfidbindungen nach Möglichkeit eingegrenzt werden.

- 3) Als eine der Hauptfunktionen der Peptidextensionen wurde die Steuerung der richtigen Zusammenlagerung dreier Ketten im Register vor der Helixbildung betrachtet [16, 32, 33]. Es sollte daher experimentell überprüft werden, ob Prokollagen bei der Helixbildung begünstigt ist gegenüber bereits umgewandeltem Kollagen.
- 4) Die Verwendung von α, α' -Dipyridyl zur Anreicherung von Prokollagen führte zwangsläufig zur Inhibition der Hydroxylierung.

Dadurch war aber auch die Stabilität der Tripelhelix herabgesetzt. Die infolge der Denaturierung veränderten Eigenschaften des Kollagens ließen es erforderlich erscheinen, die Stabilität im unhydroxylierten Zustand genauer zu analysieren.

- 5) Als Grundlage für eine zukünftige Aufklärung der physiologischen Funktionen der Zuckerreste am Kollagen sollte versucht werden, die Glycosylierung experimentell zu verfolgen.
- 6) Aus Experimenten mit isolierten Fibroblasten war bekannt, daß in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl die Sekretion des unhydroxylierten Prokollagens gehemmt ist (47). Daher sollte untersucht werden, ob in der Organkultur ein ähnlicher Effekt beobachtet werden konnte.

3. ERGEBNISSE

3.1. EINFLUSS VON α, α' -DIPYRIDYL AUF DIE PROTEINSYNTHESE UND DIE HYDROXYLIERUNG.

Um die Hemmung der Proteinbiosynthese durch α, α' -Dipyridyl zu untersuchen wurde der Einbau von $[^3\text{H}]$ -Pro in die nicht-dialysablen Proteine aus Calvariainkubationen gemessen. Obgleich die Proteine des Gewebeextraktes und die ins Medium abgegebenen getrennt aufgearbeitet wurden (s.6.2.), wurde für die Analyse der Syntheseaktivität die rechnerische Summe verwendet. Als Maß der Proteinsynthese diente nicht die Gesamtinkorporation radioaktiven Prolins während der Inkubationsdauer, sondern die Einbaurrate pro Stunde in die nicht dialysablen Proteine ($\text{CPM} \times \text{h}^{-1}$).

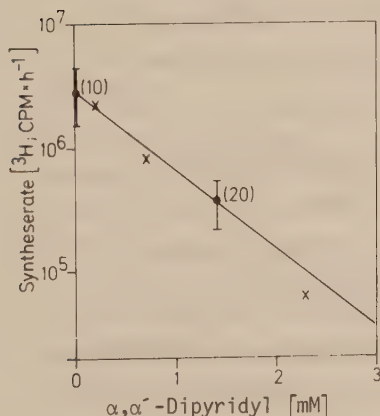


Abbildung 4:

Syntheserate in Abhängigkeit von der Konzentration α, α' -Dipyridyl während der Inkubation über 6 h mit 250 μCi $[^3\text{H}]$ -Pro / 25 Calvaria in jeweils 20 ml Medium.

Abb.4 zeigt den Einfluß von α, α' -Dipyridyl auf die Syntheserate. Sie nimmt in Konzentrationsabhängigkeit exponentiell ab. Bei Verwendung von 1.4 mM α, α' -Dipyridyl war die Syntheserate auf etwa 10% des Ausgangswertes der Kontrolle ohne α, α' -Dipyridyl zurückgegangen.

In einem weiteren Versuch wurde die Inkubationsdauer variiert bei einer gleichbleibenden Konzentration von 1.4 mM (s. Abb.5). In der Kontrolle blieb die Syntheserate über längere Zeit konstant und sank erst nach etwa 24 h geringfügig ab. Nach mehreren Tagen war sie dann allerdings deutlich reduziert. In Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl war die Syntheserate von Anfang an vermindert und sank außerdem exponentiell mit der Inkubationsdauer. Nach sechs Stunden betrug die Syntheserate dann nur noch $> 1/10$ des Kontrollwertes. Während in Abwesenheit von α, α' -Dipyridyl $\sim 3 \times 10^6$ CPM [^3H]-Pro / h eingebaut wurden, erreichte die Einbaurate in Anwesenheit von 1.4 mM α, α' -Dipyridyl $\sim 4 \times 10^5$ CPM [^3H]-Pro / h (s. Abb.5). Diese Verringerung wurde aber in Kauf genommen, da gleichzeitig die Hydroxylierung (s. unten) und die Prokollagenumwandlung (s. 3.2.) total inhibiert wurden und die markierte Kollagenmenge für die anschließenden Untersuchungen ausreichend erschien. Entsprechende Experimente mit *Sterna* hatten ergeben, daß hier nicht 1.4

mM sondern nur 0.5 mM α, α' -Dipyridyl eingesetzt werden sollten, da diese Konzentration ausreichte, Hydroxylierung und Umwandlung zu blockieren (24).

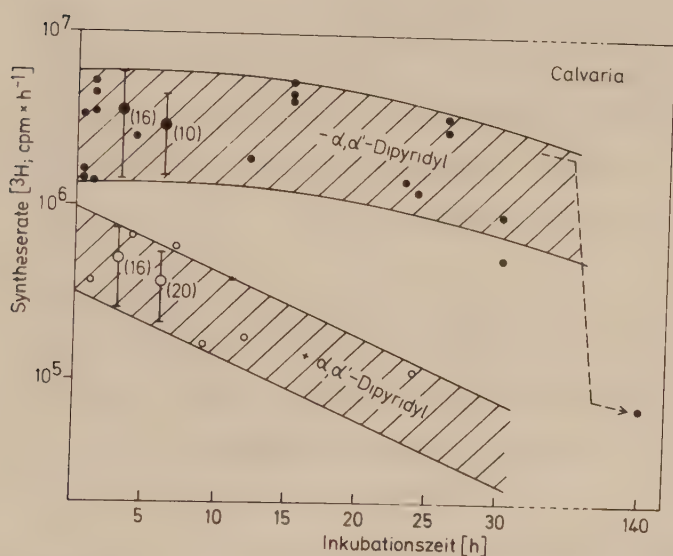


Abbildung 5:

Syntheserate, gemessen als Einbau von $[^3\text{H}]$ -Pro/h Inkubationszeit, in nichtdialysable Proteine sowohl des Gewebe-extraktes als auch des Mediums; aus Calvariakulturen.

- Inkubation in Abwesenheit von α, α' -Dipyridyl,
 - Inkubation in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl (1.4 mM).
- Für die Inkubationszeiten 3 h und 6 h wurde der Mittelwert und die Standardabweichung () mehrerer (10-20) Inkubationen angegeben.

Es mußte nun überprüft werden, ob unter diesen Inkubationsbedingungen die Hydroxylierungsreaktionen am Kollagen wirklich inhibiert wurden. Der Hydroxylierungsgrad des Prolins wurde auf zwei Wegen bestimmt (s.6.6.):

- 1) Das mit $[3,4 \text{ } ^3\text{H}]$ -Pro markierte Kollagen wurde nach Isolierung als Substrat für die Peptidylprolylhydroxylase, welche aus fötaler Rattenhaut gewonnen wurde, verwendet ⁽⁴⁾. Das dabei freiwerdende und abdestillierte $^3\text{H}_2\text{O}$ diente als Maß der Hydroxylierung.
- 2) Das mit $[^{14}\text{C}]$ -Pro oder mit $[2,3 \text{ } ^3\text{H}]$ -Pro markierte und gereinigte Kollagen wurde hydrolysiert und nach Trennung am Aminosäureanalyser die Radioaktivität des Prolins und des 4'-Hydroxylprolins getrennt gemessen.

Beide Methoden führten zu den gleichen Werten (s.Tab.2). In den Kontrollinkubationen wurden die Hydroxylierungswerte erreicht, wie sie aus Aminosäureanalysen vollhydroxylierten Kollagens bekannt sind.

α, α' -Dipyridyl inhibierte die Hydroxylierung in den verwendeten Konzentrationen vollständig. Um aufgrund experimenteller Unzulänglichkeiten gelegentlich auftretende Ver-

Tabelle 2: Hydroxylierungsgrad des Prolins

%Hydroxyprolin, bezogen auf $\Sigma(\text{Prolin} + \text{Hydroxyprolin})$.

	Typ I	Typ II	Typ III	Typ IV
<u>Kollagenanalysen:</u>				
Rind	37.8 ⁽²⁾	41.4 ⁽²⁾	53.8 ⁽²⁾	68.1 ⁽²⁾
Huhn, $\alpha 1$	46.2 ⁽¹¹⁾	47.6 ⁽¹⁰⁾	53.8 ⁽¹¹⁾	
Huhn, $\alpha 2$	46.8 ⁽⁹⁾			

Gewebekultur:

Gewebe, $-\alpha, \alpha'$ -Dip.	47.8	48.1
Medium, $-\alpha, \alpha'$ -Dip.	42.7	43.7
Gewebe, $+\alpha, \alpha'$ -Dip.	0.6*	0.3 [†]
Medium, $+\alpha, \alpha'$ -Dip.	0.7*	0.5 [†]
3 h <i>Chase</i> -Experiment	20.4	18.2
in N ₂ -Atmosphäre	36.5	
in 95% He + 5% CO ₂	43.1	

* 1.4 mM α, α' -Dipyridyl in Calvariakulturen

† 0.5 mM α, α' -Dipyridyl in Sternakulturen.

suchsansätze ausfindig machen zu können, in denen α, α' -Dipyridyl nicht in vollem Maße gewirkt hatte, mußte jedesmal der Hydroxylierungsgrad überprüft werden. Dies war besonders wichtig bei Versuchen über die Pepsinstabilität des Prokolagens (s.3.3. und 3.4.).

Die Inhibierung der Hydroxylierung durch α, α' -Dipyridyl war reversibel. In einer anschließenden Inkubation in Abwesenheit von α, α' -Dipyridyl bei gleichzeitiger Translationsinhibition durch Puromycin oder Cycloheximid (*Chase-Experiment*) konnte das angereicherte unhydroxylierte Prokollagen *nachhydroxyliert* werden. Diese Hydroxylierung fand jedoch merklich langsamer statt als unter Standardbedingungen. Außerdem wurde der Hydroxylierungsgrad der Kontrollen nicht vollständig erreicht (s.Tab.2).

Versuche, die Hydroxylierung auf eine andere Weise zu inhibieren, schlugen fehl. Weder in eisenfreiem Medium noch in sauerstoffarmer Atmosphäre unter Stickstoff oder Helium konnte eine signifikante Unterhydroxylierung erzielt werden (s.Tab.2). Da unter diesen Bedingungen das Kulturmedium nicht ausreichend pH-stabil war und infolge der ständigen Begasung einer starken Verdunstung unterlag, wurden diese Experimente nicht weiter verfolgt.

Eine kurze Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse dieses Abschnittes ist auf S. 76 in Punkt 1 gegeben.

3.2. REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON PROKOLLAGEN.

Aufgrund der zusätzlichen globulären Peptidsequenzen besitzen die ursprünglichen pro α -Ketten ein höheres Molekulargewicht als die α -Ketten des Kollagens. Da das intakte Prokollagen außerdem als pro γ -Komponente auftreten sollte, in welcher die drei pro α -Ketten über Disulfidbindungen zusammengehalten werden, wurde eine erste Identifizierung am Molekularsieb vorgenommen.

Die Aufarbeitung der radioaktiv markierten Proteine aus dem Gewebe und parallel dazu aus dem Medium wurde anfangs mit sauren Extraktionspuffern durchgeführt. Nach ausgiebiger Dialyse wurde gereinigtes Kollagen aus lathyritischer Rattenhaut für die anschließende Chromatographie zugegeben. Das lathyritische Rattenhautkollagen diente einerseits als interner Marker für verschiedene Kollagenkomponenten, andererseits begünstigte die größere Proteinmenge als Träger (*Carrier*) die Auftrennung der geringen radioaktiven Proteinmenge. Um eine Quervernetzung zu verhindern, war während der Inkubation BAPN zugegeben worden, wodurch die Lysyloxidase inhibiert wurde und somit die für Kollagen typische Quervernetzung über Aldehyd-lysylreste unterblieb (37.44.47).

Die Molekularsieb-Chromatographie an Agarose Ag.1.5 in 1M CaCl_2 ergab eine Auftrennung des in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl angereicherten Prokollagens in zwei Formen: in eine α -Komponente sowie in eine β -Komponente und höhere Polymere (s.Abb.6,C). Im Mittel betrug der Anteil der höheren Polymere 30% gegenüber etwa 70% α -Ketten, doch variierte dieses Verhältnis von Aufarbeitung zu Aufarbeitung stark. Dies gab Anlaß zu der Vermutung, daß eine dieser beiden Prokollagenformen ein Aufarbeitungsartefakt darstellte.

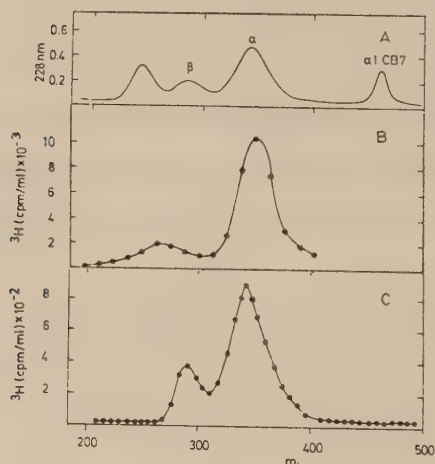


Abbildung 6:

Chromatographie an Agarose Ag 1.5 unter denaturierenden Bedingungen in 1 M CaCl_2 , 0.05 M Tris, pH 7.4, nach Denaturierung (45°C , 20 Min.). Säule 2.5×150 cm.

(A) Lathyrinisches Rattenhautkollagen;

(B) Calvariaextrakt, Inkubation (3h) mit $[^3\text{H}]$ -Pro;

(C) Calvariaextrakt, Inkubation (3h) mit $[^3\text{H}]$ -Pro in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl sauer extrahiert.

Im Vergleich dazu ist in Abb.6B das Chromatogramm einer Kontrollinkubation in Abwesenheit von α, α' -Dipyridyl gegeben. Da in Anwesenheit von BAPN die Ausbildung von Quervernetzungen blockiert worden war, zerfielen die Kollagenmoleküle aus Calvaria- und Sternaextrakten (nicht gezeigt) unter denaturierenden Bedingungen zu α -Ketten.

In Abbildung 7B ist ein Chromatogramm des sauren Calvariaextraktes nach Inkubation in Anwesenheit von 1.4 mM α, α' -Dipyridyl an Carboxymethylcellulose (CMC) gezeigt. Als Vergleich dazu ist in Abb. 7A das Chromatogramm eines sauren Extraktes

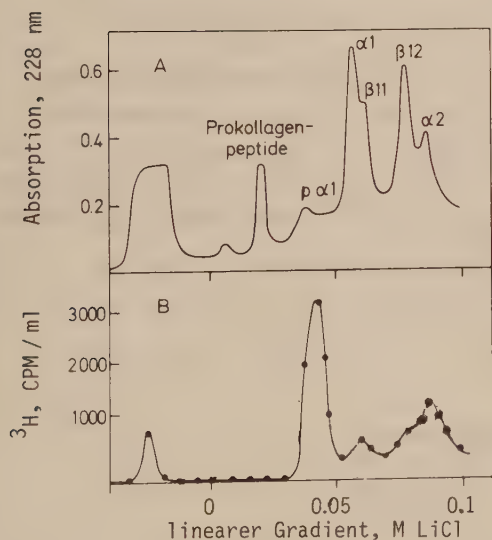


Abbildung 7:

Chromatographie an Carboxymethylcellulose (CMC) unter denaturierenden Bedingungen (44°C) in 1 M Harnstoff, 0.02 M Kaliumazetat, pH 4.8. Die Proben wurden vorher denaturiert (45°C , 20 Min.). Die Säule (1.5×10 cm) wurde mit einem linearen Gradienten von 0–0.11 M LiCl über 800 ml eluiert.

(A) Extrakt aus fötaler Kalbshaut.

(B) Calvariaextrakt nach Inkubation (3h) mit $[^3\text{H}]$ -Pro in Anwesenheit von 1.4 mM α, α' -Dipyridyl, sauer extrahiert.

aus fötaler Kalbshaut gegeben. Vor den $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Ketten und ihren Quervernetzungsprodukten $\beta 11$ und $\beta 12$ eluiert die $p \alpha 1$ -Kette sowie Prokollagenpeptide. Die aufgefundenen Prokollagenpeptide und das Prokollagen in diesem embryonalen Gewebe sind vermutlich Ausdruck einer hohen Syntheserate⁽⁵²⁾. Die Hauptkomponente des in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl angereicherten Prokollagens wird in der $p \alpha 1$ -Position abgetrennt (s. Abb. 7B). Die $p \alpha 2$ -Ketten cochromatographieren mit den $\alpha 2$ -Ketten.

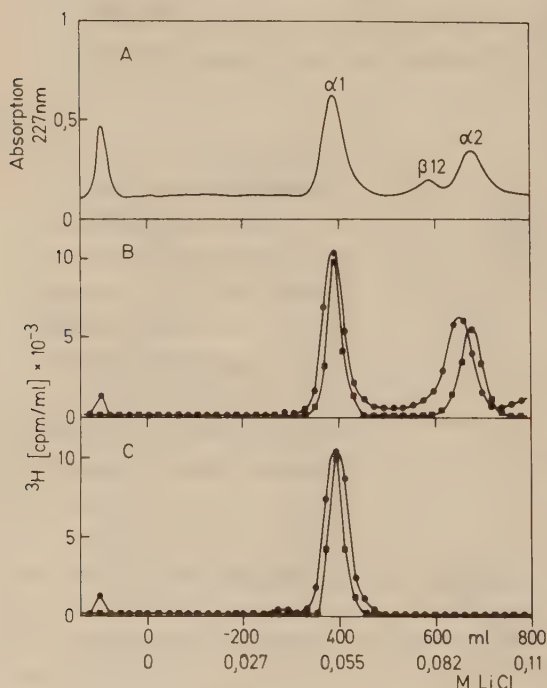


Abbildung 8:

OMC-Chromatographie unter denaturierenden Bedingungen.

(A) Lathyrisches Rattenhautkollagen;

(B) Gewebeextrakt von Calvaria;

(C) Gewebeextrakt von Sterna; jeweils nach Inkubation (3h) mit $[^3\text{H}]$ -Pro, vor (—○—○—○—) sowie nach Pepsinbehandlung (—■—■—■—).

Als Vergleich sind in Abb.8 die Chromatogramme aus Kontrollinkubationen von Calvaria und Sterna gegeben. Sie zeigen wie zu erwarten die $\alpha 1(I)$ - und $\alpha 2$ -Ketten im Fall der Calvaria (B) und die $\alpha 1(II)$ -Ketten im Fall der Sterna(C). Auch die in der CMC-Chromatographie auftretenden $p\alpha$ -Ketten nach saurer Aufarbeitung lassen eine partielle Degradation der $p\gamma$ -Komponenten vermuten, welche über intramolekulare Disulfidbindungen zusammengehalten sein sollten.

Um diese Degradation zu vermeiden, wurde im Folgenden neutral extrahiert und jeder Schritt im Säuren vermieden. Gleichzeitig wurden als Proteaseinhibitoren EDTA (10 mM), Phenylmethansulfonylfluorid (0.2 μ M) und 4-(Chrommercuri)-benzoat (0.1 μ M) zugesetzt⁽²⁸⁾. In Abb. 9.D ist als Ergebnis dieser Bemühungen zu erkennen, daß das so aufgearbeitete, in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl angereicherte Prokollagen an Agarose Ag 1.5 nur noch $p\gamma$ -Komponenten aufwies. Dialysiert man dagegen den neutralen Extrakt vor der Chromatographie gegen verdünnte Essigsäure, ist wiederum eine $p\alpha$ -Komponente zu erkennen (s. Abb.9,C).

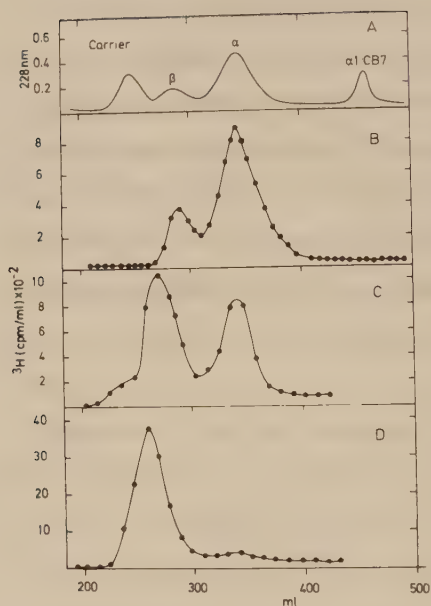


Abbildung 9:

Agarose Ag 1.5-Chromatographie unter denaturierenden Bedingungen.

(A) Lathyritisches Rattenhautkollagen.

(B-D) Calvariaextrakt; Inkubation (6h) mit $[^3\text{H}]$ -Pro in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl.

(B) Aufarbeitung im Sauren

(C) Extraktion im Neutralen, anschließend Dialyse gegen 0.1% Essigsäure.

(D) Aufarbeitung nur im Neutralen.

In Abb.10 sind die CMC-Chromatogramme der neutralen Gewebeerextrakte aus Calvaria und Sterna gegeben, welche in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl inkubiert worden waren. Die Hauptkomponente eluierte diesmal in der Gegend der $\alpha 2$ -Ketten, und zwar sowohl im Fall der Calvariaextrakte als auch im Fall der Sternaextrakte (s. Abb.10, B und C, —●—●—). Die Rechromatographie dieser Fraktion an Agarose Ag 1.5 zeigte, daß es sich hierbei um eine γ -Komponente handelte (nicht gezeigt).

Die ebenfalls auftretenden- $\rho\alpha 1$ -Ketten (s. Abb. 10, B und C, $\bullet\bullet\bullet$) können auf eine teilweise Degradation der $\rho\gamma$ -Komponenten während der Dialyse für die CMC-Chromatographie bei pH 4.8 zurückgeführt werden.

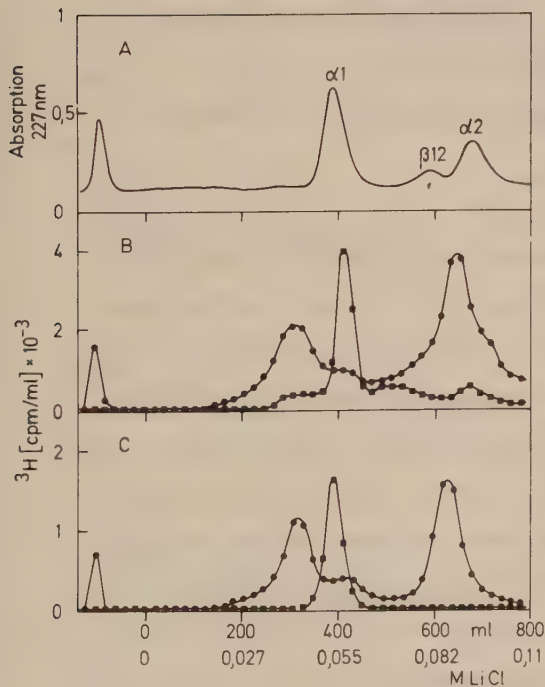


Abbildung 10:

CMC-Chromatographie unter denaturierenden Bedingungen.

(A) Lathyritisches Rattenhautkollagen.

(B) Gewebeextrakt von Calvaria nach Inkubation (6h) mit [^3H]-Pro in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl, neutralsalzextrahiert, vor ($\bullet\bullet\bullet$) und nach Pepsinbehandlung ($\square\square\square$).

(C) Gewebeextrakt von Sterna, sonst wie (B).

Die Proformen können durch Behandlung mit Pepsin unter Abspaltung der nicht tripelhelikalen Prokollagenpeptide in die α -Ketten übergeführt werden. Die Bildung der Tripelhelix, in der die Kollagenketten gegen Proteolyse beständig sind, erfolgte im Fall des unhydroxylierten Kollagens erst während der Aufarbeitung bei 4°C. Die Pepsinbehandlung wurde dann bei 18°C durchgeführt. In beiden Geweben erkennt man deutlich die jetzt auftretenden $\alpha 1$ -Ketten (s. Abb. 10, B und C, ). Das Fehlen der $\alpha 2$ -Ketten im Fall der Calvaria wird später erörtert (S. 3.4).

Da die Lysyloxidase irreversibel durch BAPN blockiert worden war, andererseits Prokollagen zum Unterschied von Typ I und II Kollagen Cystein enthält, sollte der Zusammenhalt der $\gamma\gamma$ -Komponenten nur über S-S-Brücken gewährleistet werden können. Unter reduzierenden Bedingungen sollten diese $\gamma\gamma$ -Komponenten daher in $\alpha\alpha$ -Ketten zerfallen. Das Ergebnis einer Reduktion ist in Abb. 11 anhand einer Gel-Elektrophorese in SDS wiedergegeben. Die Kontrolle (1h inkubiert) enthält ein Gemisch aus $\gamma\gamma$ und normalem Kollagen (s. Abb. 11, A ). Nach Reduktion geht die $\gamma\gamma$ -Komponente in $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Ketten über. In Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl entstehen im Gewebe nur $\gamma\gamma$ -Komponenten, wie schon beschrieben (s. Abb. 11, B). Diese können ebenfalls durch Reduktion in $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Ketten übergeführt werden (s. Abb. 11, B ). Daneben sind keine $\alpha 1$ - oder

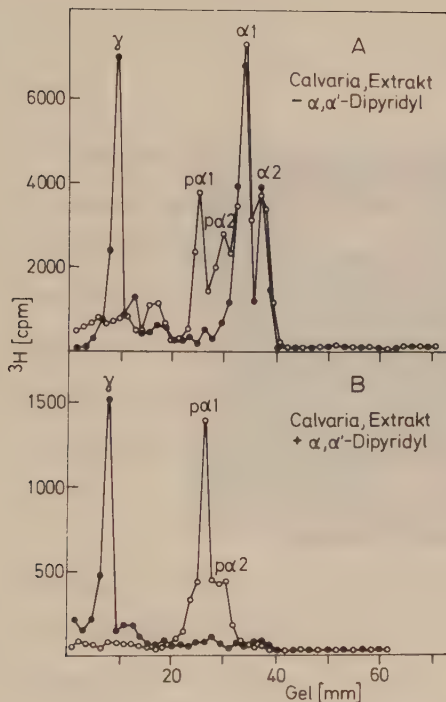


Abbildung 11:

Gel-Elektrophorese in SDS (5%) (s.6.5.). Calvariaextrakte nach Inkubation mit ^3H -Pro;

(A) in Abwesenheit von α, α' -Dipyridyl, 1 h;

(B) in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl, 6 h;

im reduzierten (○-○-○) und im nicht reduzierten (●-●-●) Zustand.

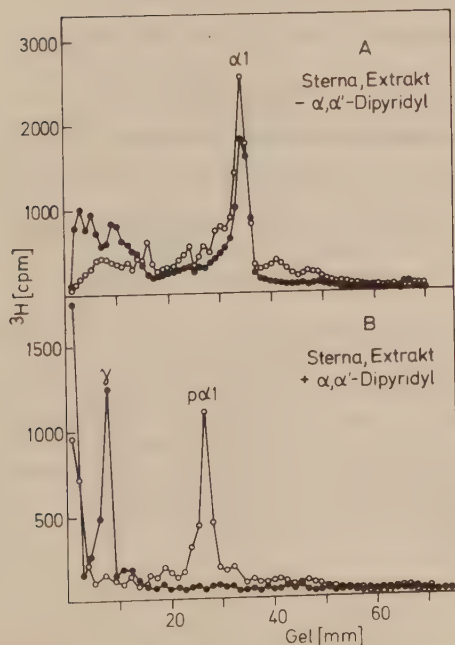


Abbildung 12:

Gel-Elektrophorese in SDS (5%) (s.6.5.).

Sternaextrakte nach Inkubation mit ^3H -Pro, 3 h;

(A) in Abwesenheit von α, α' -Dipyridyl;

(B) in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl;

im reduzierten (○-○-○) und im nicht reduzierten (●-●-●) Zustand.

$\alpha 2$ -Ketten zu beobachten. Der gleiche Versuch wurde auch mit Sternaextrakten durchgeführt (s. Abb. 12). Hier treten nach Reduktion der $p\gamma$ -Komponenten, wie bei Typ II Kollagen zu erwarten, nur $p\alpha 1(II)$ -Ketten auf (s. Abb. 12, B; $\text{---}\text{O}\text{---}\text{O}\text{---}\text{O}\text{---}$). Um den Einwand zu entkräften, die S-S-Bindungen der $p\gamma$ -Komponenten seien erst im Laufe der Extraktion ausgebildet worden, erfolgten die Extraktionen zusätzlich in Anwesenheit von JAc (50mM).

Nachdem bekannt geworden war, daß die erste Vorstufe des Kollagens sowohl aminoterminal als auch carboxyterminale Prokollagenpeptide enthält (s. Abb. 2) ⁽³⁰⁾, erhob sich die Frage, ob das in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl angereicherte Prokollagen diesen ersten Vorläufer darstellt oder ein angereichertes Zwischenprodukt der Prokollagenumwandlung. Daher wurden SLS-Kristallite präpariert und im EM untersucht (s. 6.8.). In Abb. 13 ist neben dem SLS aus normalem Kollagen (B) das Bild in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl angereicherten Prokollagens aus Calvaria angegeben (A). Man erkennt deutlich gegenüber normalem Kollagen eine globuläre Verlängerung am Carboxyterminus. Aminoterminal ist demgegenüber kein derartiger Unterschied zu beobachten. Zum Vergleich ist auch ein SLS eines Prokollagens aus dermatosparaktischer Kalbshaut gezeigt (s. Abb. 13, C), welches nur ein aminoterminales Prokollagenpeptid enthält.

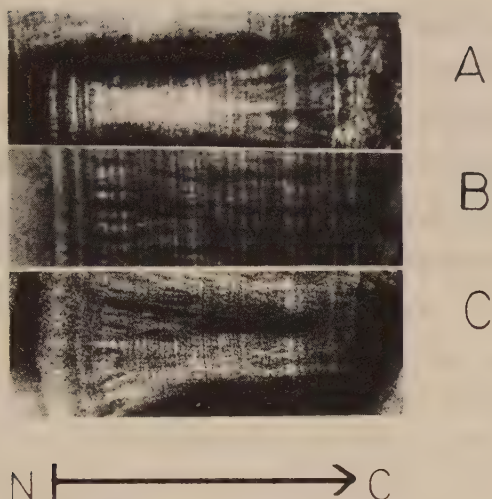


Abbildung 13:

SLS bei positiver Anfärbung mit Uranylazetat und Phosphorwolframsäure.

A : In Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl synthetisiertes Prokollagen aus Calvariaextrakt.

B : In Abwesenheit von α, α' -Dipyridyl synthetisiertes Kollagen aus Calvariaextrakt.

C : Prokollagen aus dermatosparaktischer Kalbshaut.

In der Dermatosparaxie ist die Prokollagenpeptidase inaktiv, welche die aminoterminaler Verlängerung abspaltet^(16, 25, 26). Aus diesem Ergebnis folgt, daß α, α' -Dipyridyl nur die carboxyterminal wirksame Prokollagenpeptidase inhibiert.

Bisher wurden nur die Gewebeextrakte analysiert. An Abb.14 sind die Agarose Ag 1.5 - Chromatogramme der ins Medium abgegebenen Kollagenprodukte wiedergegeben. Die Kontrolle ohne α, α' -Dipyridyl lässt als Hauptkomponente die α -Ketten erkennen, gleichzeitig treten aber auch zwei Fraktionen niedrigen Molekulargewichts auf (s. Abb.14, B $\bullet\bullet\bullet$). Sie können auch mit Cystein und Tryptophan markiert werden, zwei Aminosäuren, welche nicht in den α -Ketten des Typ I oder II Kollagens auftreten (nicht gezeigt).

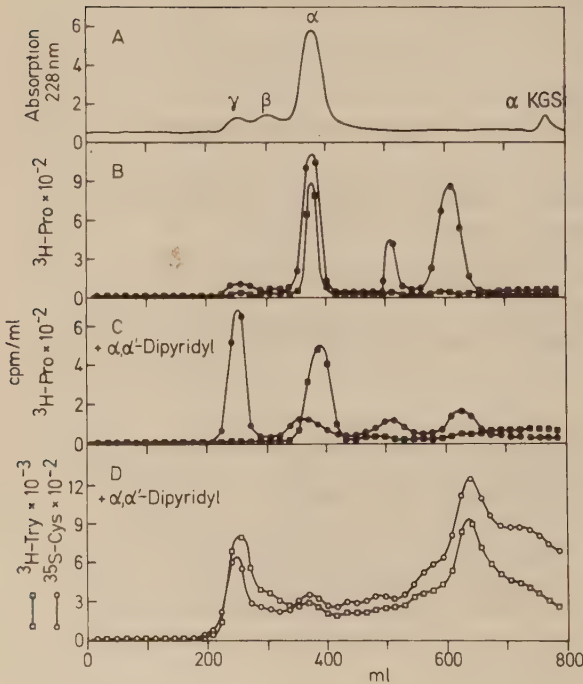


Abbildung 14:

Agarose Ag 1.5 - Chromatographie unter denaturierenden Bedingungen.

(A) Lathyritisches Rattenhautkollagen

(B) Medienproteine aus Calvaria nach Inkubation mit $[^3\text{H}]$ -Pro vor ($\bullet\bullet\bullet$) und nach Pepsinbehandlung ($\blacksquare\blacksquare\blacksquare$).

(C) Medienproteine aus Calvaria mit $[^3\text{H}]$ -Pro in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl vor ($\bullet\bullet\bullet$) und nach Pepsinbehandlung ($\blacksquare\blacksquare\blacksquare$).

(D) Medienproteine aus Calvaria nach Inkubation mit $[^3\text{H}]$ -Try ($\square\square\square$) und $[^{35}\text{S}]$ -Cys ($\circ\circ\circ$) in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl.

Im Gegensatz dazu können nach Inkubation in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl vor allem p γ -Komponenten erkannt werden, während die beiden Peptidfraktionen nur in geringem Maß abgetrennt werden (s. Abb. 14, C, $\bullet\bullet\bullet$). Durch Pepsinbehandlung bei 18°C werden die p γ -Komponenten in α -Ket-ten übergeführt, während die Prokollagenpeptide ganz abgebaut werden (s. Abb. 14, C, $\blacksquare\blacksquare\blacksquare$).

Um nachzuweisen, ob die in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl angereicherten p γ -Komponenten wirklich Vorläufer des Kollagens darstellten, wurde ein *Pulse-Chase*-Experiment durchgeführt: Zwei Proben wurden für eine bestimmte Zeit in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl mit radioaktiven Aminosäuren inkubiert (*Pulse*-Experiment). Während die Inkubation des einen Ansatzes abgestopt wurde, wurde die Inkubation des zweiten Ansatzes in frischem Medium fortgeführt (*Chase*-Experiment (s. 6.2.1.)). Dieses enthielt kein α, α' -Dipyridyl und die radioaktiv markierten Aminosäuren waren durch einen Überschuß entsprechender unmarkierter Aminosäuren ersetzt. Außerdem wurde Puromycin oder Cycloheximid (25 $\mu\text{g/ml}$) zugesetzt, um sicherzustellen, daß keine *de novo*-Synthese stattfindet. In Kontrollversuchen war ermittelt worden, daß diese Konzentration ausreichte, die Translation vollständig zu inhibieren, so daß während der *Chase*-Periode nur die in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl angereicherten Vorstufen in Kollagen umgewandelt werden konnten.

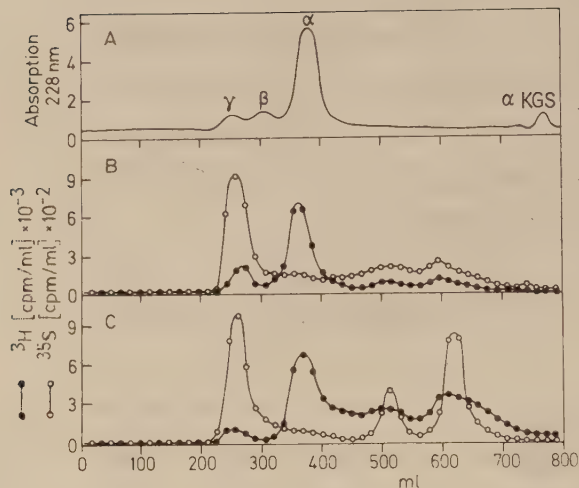


Abbildung 15:

Agarose Ag 1.5 - Chromatographie unter denaturierenden Bedingungen.

(A) Lathyritisches Rattenhautkollagen;

(B) Calvariaextrakt in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl inkubiert (6h) mit $[^3\text{H}]$ -Pro (—●—●—●) und $[^{35}\text{S}]$ -Cys (—○—○—○) anschließend in Abwesenheit von α, α' -Dipyridyl, aber in Anwesenheit von Puramycin weiterinkubiert (3h Chase).

(C) Medienproteine von (B).

Die Agarose Ag 1.5 - Chromatogramme eines Chase-Ansatzes aus Calvaria sind in Abb.15 für den Gewebeertrakt (B) und für das Medium (C) gezeigt. Der Hauptanteil der mit $[^3\text{H}]$ -Pro markierten p γ -Komponenten ist demnach in die α -Ketten übergegangen. Die Markierung mit Cystein zeigt aber, daß die Umwandlung der p γ -Komponenten zu den α -Ketten noch nicht vollständig abgelaufen ist (s. Abb.15, B —○—○—○). Ein ähnliches Ergebnis ist im Medium zu finden; doch erkennt man hier zusätzlich die abgespaltenen Prokollagenpeptide, welche deutlich mit Cystein markiert sind (s. Abb.15, C —○—○—○).

Bei Doppelmarkierungsexperimenten mit Cystein und Tryptophan (nicht gezeigt) wurde deutlich, daß die Peptidfraktion mit dem niedrigeren Molekulargewicht im Laufe eines *Chase* früher auftrat. Diese war auch relativ stärker mit Cystein markiert. Andererseits trat die Fraktion mit dem höheren Molekulargewicht relativ spät auf und enthielt einen höheren Anteil an Tryptophan.

Die Menge der Peptide nahm im Medium einer *Chase*-Phase über 24 h konstant zu. Währenddessen traten keine Fraktionen geringeren Molekulargewichts auf. Die Prokollagenpeptidfraktionen besaßen die gleichen chromatographischen Eigenschaften wie die während der Inkubation in Abwesenheit von α, α' -Dipyridyl abgespaltenen Prokollagenpeptide (s. Abb. 14, B,  auf S. 34).

Abbildung 16 zeigt ein charakteristisches Elutionsprofil der Proteine einer *Chase*-Phase an CMC. Der Übergang zum Kollagen wird deutlich durch das Auftreten der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Ketten, welche nicht mit Cystein markiert sind. Im Medium tauchen zusätzliche Fraktionen auf, welche früher als die $p\alpha$ -Ketten eluieren und relativ stark mit Cystein markiert sind.

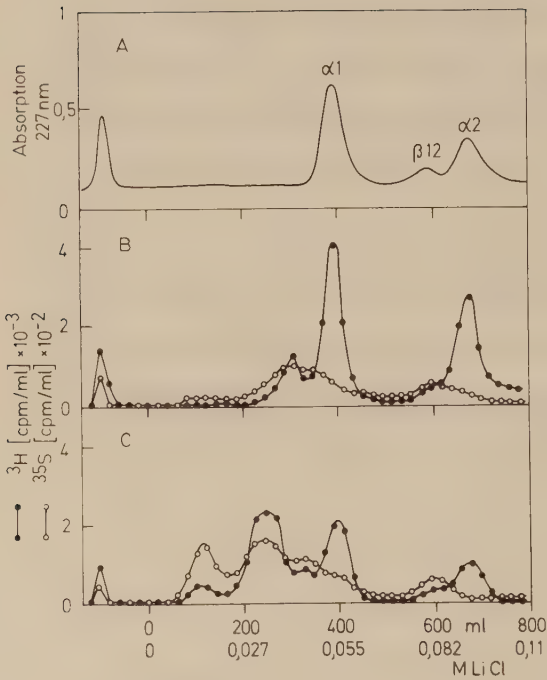


Abbildung 16:

CMC-Chromatographie unter denaturierenden Bedingungen.

(A) Lathyritisches Rattenhautkollagen.

(B) Calvariaextrakt, in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl inkubiert (6h) mit $[^3\text{H}]$ -Pro ($\bullet\bullet\bullet$) und $[^{35}\text{S}]$ -Cys, ($\circ\circ\circ$), anschließend in Abwesenheit von α, α' -Dipyridyl, aber in Anwesenheit von Puromycin weiterinkubiert (3h Chase).

(C) Medienproteine von (B).

Eine kurze Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse dieses Abschnittes ist auf S. 76 in Punkt 2 gegeben.

3.3. VERSUCHE ZUR FUNKTION DES PROKOLLAGENS BEI DER REGISTERFINDUNG.

Allgemein wird angenommen, daß eine der wesentlichen Funktionen der Prokollagenpeptide die Bildung des korrekten Registers dreier pro α -Ketten ist (*Registrationspeptide*)^(16, 32, 33). Bevor sich nämlich die Tripelhelix formieren kann, müssen die drei pro α -Ketten in die richtige räumliche Anordnung zueinander gebracht worden sein.

In vitro-Renaturierungsversuche mit denaturiertem Typ I Kollagen, einem Gemisch aus $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Ketten, ergaben, daß sich die Tripelhelix wiederherstellen läßt^(3, 53-55). Die Rückbildung des Moleküls erfolgt aber nur teilweise und läuft im Gegensatz zu den *in vitro*-Bedingungen viel langsamer⁽³²⁾ und als konzentrationsabhängige Reaktion⁽⁵⁵⁾ ab.

Es sollte daher zunächst festgestellt werden, ob die drei Polypeptidketten in Form der p γ -Komponenten so zusammengehalten werden, daß die Helixbildung begünstigt wird, d.h. daß sie schneller und in einem größeren Ausmaß ablaufen kann.

Mit Hilfe einer Pepsinbehandlung kann die tripelhelikale Form des Kollagens von anderen Konformationen unterschieden werden^(19, 31); Während die meisten Proteine wie die nicht tripelhelikalen Telo-peptide und Prokollagenpeptide, aber auch de-

naturiert vorliegendes Kollagen (also auch unhydroxyliertes bei Temperaturen über 18°C) von Pepsin zerstört werden, hält das tripelhelikale Kollagenmolekül der proteolytischen Aktivität stand. Nach der Aufarbeitung bei 4°C lag das Kollagen, auch das unhydroxylierte, in tripelhelikaler Form vor ⁽²³⁾. Um einer Denaturierung vorzubeugen, wurde die Pepsinbehandlung unterhalb der Denaturierungstemperatur bei 18°C durchgeführt. Die beständigen Kollagenanteile wurden anschließend chromatographisch charakterisiert. Als Bezugspunkt (=100%) bei der Auswertung diente die Gesamtheit der extrahierten und nicht dialysablen Proteine, welche mit $[^3\text{H}]$ -Pro markiert waren.

In Versuch 1 in Abbildung 17 sollte mittels derartiger Pepsinbehandlungen der relative Anteil des tripelhelikalen Kollagens parallel in drei verschiedenen Extrakten festgestellt werden (s.A,1; B,1; C,1). Diese Extrakte stammen aus Calvaria nach einer Kontrollinkubation über 6h (A), nach einer Kurzinkubation über 1h (B) und nach einer Inkubation in Anwesenheit von $1.4\text{ mM } \alpha, \alpha'\text{-Dipyridyl}$ über 6h (C). In einem 2.Versuch wurde die Tripelhelix durch 20 minütiges Erwärmen bei 45°C denaturiert und anschließend der Pepsinbehandlung unterzogen. In diesem 2.Versuch (s.A,2; B,2; C,2) wurden als Folge der vorausgegangenen Denaturierung auch die α -Ketten des Kollagens fast vollständig zerstört. Im 3.Versuch wurden die

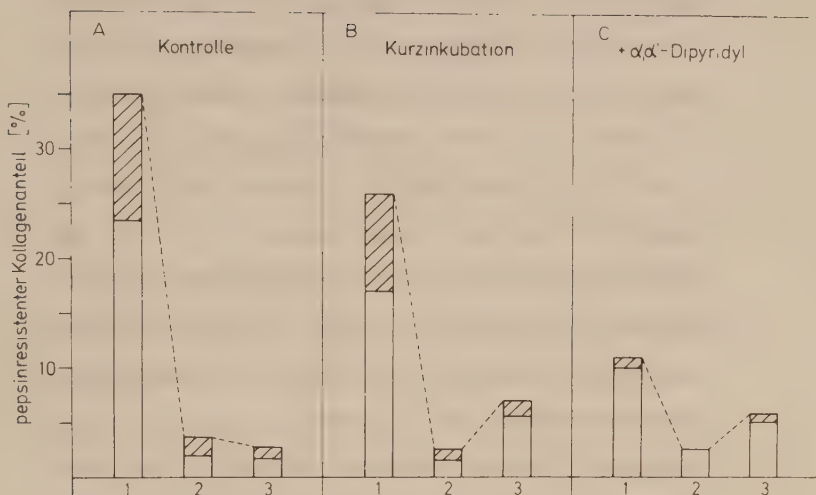


Abbildung 17:

Chromatographierbarer Anteil eines Calvariaextraktes nach Pepsinbehandlung (bei 18°C). 100% = Gesamtradioaktivität ($[^3\text{H}]$ -Pro) vor Pepsinbehandlung.

(A) Inkubation (6h) in Abwesenheit von α, α' -Dipyridyl.

(B) Inkubation (1h) in Abwesenheit von α, α' -Dipyridyl.

(C) Inkubation (6h) in Anwesenheit von 1.4 mM α, α' -Dipyridyl.

1: Probe pepsinbehandelt.

2: Probe unmittelbar vor Pepsinbehandlung bei 45°C 20 Min. denaturiert.

3: Probe bei 45°C 20 Min. denaturiert, anschließend 6 Tage bei 4°C gehalten, dann pepsinbehandelt bei 18°C.

Schraffiert: α_2 -Anteil, darunter weiß: α_1 -Anteil, beide an CMC chromatographisch ermittelt

Proben nach der Denaturierung bei 45°C 6 Tage bei 4°C gehalten und anschließend der Pepsinbehandlung bei 18°C unterzogen. Im Fall des Kollagens aus Kontrollinkubationen konnte hierbei keine Renaturierung gefunden werden (s. Abb. 17, A, 3). Diese hätte sich nämlich durch vermehrte Beständigkeit bemerkbar machen sollen.

Der Gewebeextrakt nach einer Kurzinkubation über 1 h enthielt u.a. Prokollagen, welches noch nicht zu Kollagen umgewandelt worden war. Dieses vollhydroxylierte Prokollagen konnte renaturieren, so daß seine ursprüngliche Pepsinstabilität zu etwa $1/3$ erreicht wurde (s. Abb. 17, B, 3).

Wurde das Prokollagen dagegen in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl angereichert, so konnte es erst während der Aufarbeitung bei 4°C eine Tripelhelix bilden, da es kein Hydroxyprolin enthielt. Insofern war in diesem Fall also bereits Versuch 1 - Pepsinbehandlung des frischen Extraktes - eine Helixbildung *in vitro* vorausgegangen (s. Abb. 17, C, 1). Im Renaturierungsexperiment nach Denaturierung bei 45°C erreichte der pepsinstabile Anteil dieser $\text{p}\gamma$ -Komponenten über die Hälfte des ursprünglichen Wertes (s. Abb. 17, C, 3). Der Verlust der $\alpha 2$ -Ketten (schraffiert) wird im nächsten Abschnitt (s. 3.4.) besprochen.

Da die drei in Abb. 17 gezeigten Versuche jeweils mit mehreren Proben parallel durchgeführt werden mußten, erfolgte die

Renaturierung bei 4°C aus experimentellen Gründen im Anschluß an die Denaturierung 6 Tage lang. Die gleichen Ergebnisse erhält man aber auch, wenn wesentlich kürzere Renaturierungszeiten von 1-2 Tagen eingehalten wurden.

Nach Inkubation in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl ist der Anteil des pepsinstabilen Kollagens unmittelbar nach der Denaturierung (s. Abb. 17, C, 2) im Vergleich mit dem nicht denaturierten Anteil (s. Abb. 17, C, 1) unverhältnismäßig hoch. Dies kann darauf zurückzuführen sein, daß nach der Denaturierung bei 45°C während der Abkühlung auf 18°C als Vorbereitung der Pepsinbehandlung ein Teil der $p\gamma$ -Komponenten bereits wieder eine Tripelhelix bilden konnte.

Dieser Versuch zeigt klar, daß die über Disulfidbrücken zusammengehaltenen $p\alpha$ -Ketten im richtigen Register zueinander liegen. Somit konnte demonstriert werden, daß die Helixbildung *in vitro* durch die Disulfidbindungen im Prokollagen begünstigt wird. Dies führte zu der Frage, inwieweit die S-S-Brücken auch in der Zelle für die richtige Aneinanderlagerung der $p\alpha$ -Ketten und die Bildung der Tripelhelix essentiell sind. Es ist nämlich noch nicht klar, ob die Helixbildung in der Zelle unmittelbar nach der richtigen Zusammenlagerung der Prokollagenpeptidbereiche erfolgt oder ob noch eine gewisse Zeit

verstreicht. Daher sollte festgestellt werden, ob die Tripelhelixbildung auch dann ablaufen kann, wenn die Ausbildung von S-S-Brücken während der Synthese verhindert wird. Dieses Ziel sollte mit Hilfe von Thioverbindungen erreicht werden (s.Tab.3).

Zunächst mußte festgestellt werden, ob diese reduzierenden Substanzen die Proteinbiosynthese in toxischer Weise beeinträchtigten. In Abb.18 ist als Beispiel der Einfluß von Dithioerythrit (DTT) auf *Calvaria* angegeben. Überraschenderweise wird die Syntheserate zunächst in einem niedrigen Konzentrationsbereich erhöht, um ab 50 $\mu\text{g/ml}$ abzunehmen. Einen ähnlichen Einfluß hatte auch Unithiol auf die Syntheserate (nicht gezeigt). Im Fall von D-Penicillamin konnten keine toxischen Konzentrationen ermittelt werden, während L-Penicillamin bereits ab 1 $\mu\text{g/ml}$ die Proteinsynthese hemmte.

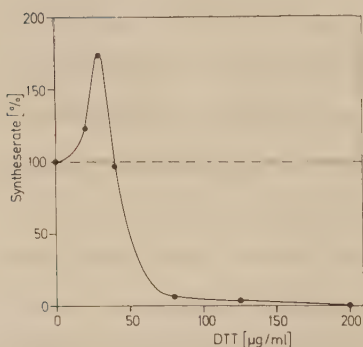


Abbildung 18:

Syntheserate im Vergleich mit der Kontrolle (=100%) in Abhängigkeit von der Konzentration Dithioerythrit (DTT) während der Inkubation.

Tabelle 3:

SH-Reagenzien, Cysteinanaloge	Konzentrations- bereich	Auswirkung auf die Synthese
DTT	10 - 200 $\mu\text{g} / \text{ml}$	s.Abb.18
Unithiol	10 - 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$	entspricht DTT
D-Penicillamin	7.5 - 225 $\mu\text{g} / \text{ml}$	nicht toxisch
L-Penicillamin	0.2 - 5 $\mu\text{g} / \text{ml}$	toxisch
Glutathion, reduziert	80 $\mu\text{g} / \text{ml}$	-
Glutathionreduktase	250 - 500 $\mu\text{g} / \text{ml}$	-
S-Methyl-Cystein	0.2 - 5 mM	-
S-Äthyl-Cystein	2 - 20 mM	-

Nachdem also die nicht toxischen Konzentrationsbereiche ermittelt waren, wurden die SH-Reagenzien versuchsweise als Inhibitor bei der Bildung von p γ -Komponenten des Prokollagens verwendet. Um deren Wirkung deutlich erkennen zu können, wurden die Thioverbindungen in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl eingesetzt. Obgleich sie bereits wiederholt mit Erfolg intrazellulär eingesetzt worden waren (^{23.56}), konnten sie die Bildung der p γ -Komponenten nicht verhindern. Da das Prokollagen immer nur als p γ -Komponente extrahiert werden konnte, wurde ebenfalls versucht, die Bildung der S-S-Bindungen durch den Einbau von Cysteinanaloge zu blockieren (s.Tab.3.). Anscheinend wurden aber diese Analoga nicht anstelle von Cystein eingebaut, da wiederum nur p γ -Komponenten extrahiert werden konnten.

Eine kurze Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse dieses Abschnittes ist auf S. 77 in Punkt 3 gegeben.

3.4. KETTENAUSWAHL UND STABILITÄT DER TRIPLEHELIX UNTER DEM EINLUSS VON α, α' -DIPYRIDYL.

Da denaturiert vorliegendes Kollagen auf die Physiologie des Bindegewebes einen entscheidenden Einfluß hat, sollte die Stabilität im unhydroxylierten Zustand analysiert werden. Mit Hilfe von Pepsinbehandlungen sollte wie im vorhergehenden Abschnitt (s.3.3.) die tripelhelikale Konformation von der globulären unterschieden werden. Im Laufe der Untersuchungen mit Pepsin ergaben sich jedoch Anhaltspunkte dafür,

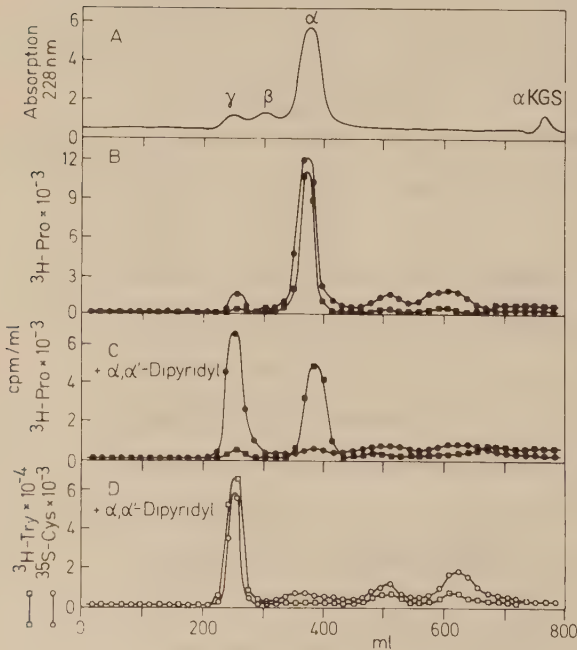


Abbildung 19:

Agarose Ag 1.5 - Chromatographie unter denaturierenden Bedingungen.

(A) Lathyrisches Rattenhautkollagen.

(B) Calvariaextrakt nach Inkubation (3h) mit ^3H -Pro, vor (—●—●—) und nach Pepsinbehandlung (—■—■—).

(C) Calvariaextrakt nach Inkubation (3h) mit ^3H -Pro in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl, vor (—●—●—) und nach Pepsinbehandlung (—■—■—).

(D) Calvariaextrakt nach Inkubation (3h) mit ^3H -Try (—□—□—) und ^{35}S -Cys (—○—○—) in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl.

daß der Selektionsprozeß in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl gestört ist. Bei der Zusammenlagerung der drei pro α -Ketten muß bei Typ I Kollagen auch eine Kettenauswahl erfolgen, so daß jeweils zwei pro $\alpha 1$ - und eine pro $\alpha 2$ -Kette zusammengeführt werden.

Bei Pepsinbehandlungen bei 18°C wurden die in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl entstandenen $p\gamma$ -Komponenten durch die Zerstörung der nicht tripelhelikalen Prokollagenpeptide in α -Ketten übergeführt (s. Abb. 19, C). Dagegen enthielt das vollhydroxylierte Kollagen nur α -Ketten, sowohl vor als auch nach Pepsinbehandlung (s. Abb. 19, B). Während die $p\gamma$ -Komponenten des in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl synthetisierten Prokollagens nach der Pepsinbehandlung bei 18°C nur noch $\alpha 1$ -Ketten enthielt, wie die CMC-Chromatographie ergibt (s. Abb. 20, C, ) , können nach der Pepsinbehandlung von Kontrollinkubationen $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Ketten im ursprünglichen Verhältnis von 2:1 an CMC gefunden werden (s. Abb. 20, B ).

Untersuchungen des in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl angereicherten Prokollagens hatten aber bereits ergeben, daß dieses sowohl $p\alpha 1$ -, als auch $p\alpha 2$ -Ketten enthielt. Dies war nach Reduktion an der Gel-Elektrophorese in SDS (s. S. 31, Abb. 11, B, ) und nach Aufarbeitung in sauren Puffern an

CMC (s.Abb.20, C, —○—○—○) gezeigt worden. Das hierbei abzuschätzende Verhältnis der $\alpha 1$ - zu den $\alpha 2$ -Ketten lag bei etwa 3:1. Ähnliche Ergebnisse ergab auch das *Pulse-Chase*-Experiment unter Ausschluß einer neuen Proteinsynthese, wobei $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Ketten ungefähr im Verhältnis von 2:1 aufgetrennt wurden (s.Abb.16, B, —●—●—● auf S.36).

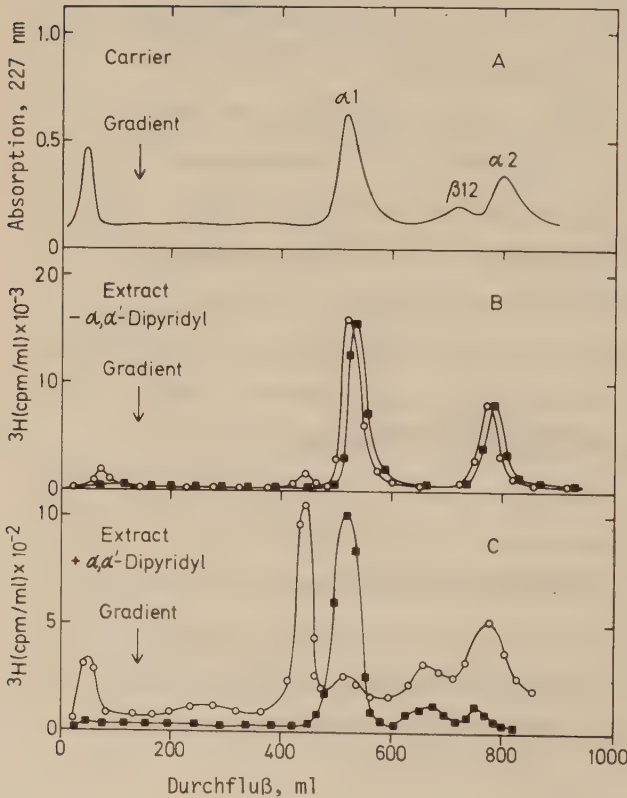


Abbildung 20:

CMC-Chromatographie unter denaturierenden Bedingungen.

(A) Lathyrisches Rattenhautkollagen.

(B) Calvariaextrakt nach Inkubation (3h) mit $[^3\text{H}]$ -Pro, vor (—○—○—○) und nach Pepsinbehandlung (—■—■—■).

(C) Calvariaextrakt nach Inkubation (3h) mit $[^3\text{H}]$ -Pro in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl, im Sauren aufgearbeitet, vor (—○—○—○) und nach Pepsinbehandlung (—■—■—■).

Da es unwahrscheinlich ist, daß $p\alpha 2$ -Ketten, welche zusammen mit $p\alpha 1$ -Ketten in eine Tripelhelix eingebaut sind, selektiv von Pepsin zerstört werden können, andererseits aber sämtliche $p\alpha 2$ -Ketten in Form von $p\gamma$ -Komponenten vorkamen, mußte angenommen werden, daß die $p\gamma$ -Komponenten in mindestens zwei verschiedenen Zusammensetzungen vorkamen: zum einen nur aus $p\alpha 1$ -Ketten aufgebaute und daneben solche, welche nur $p\alpha 2$ -Ketten enthielten. Aus Denaturierungsexperimenten von hydroxylierten *künstlichen* $[\alpha 1(I)]_3^-$ und $[\alpha 2]_3^-$ Molekülen weiß man, daß die $\alpha 2$ -Trimere eine wesentlich niedrigere Denaturierungstemperatur besitzen als die $[\alpha 1(I)]_3^-$ Helices ⁽⁵⁴⁾. Daher lag die Vermutung nahe, daß auch die Tripelhelix $[p\alpha 2]_3$ in nicht hydroxyliertem Zustand eine tiefere Denaturierungstemperatur besitzt als die $[p\alpha 1(I)]_3$. Dies wäre auch eine Erklärung dafür, warum nach Pepsinbehandlungen bei 18°C zwar die $[p\alpha 1(I)]_3^-$, nicht aber die $[p\alpha 2]_3$ -Moleküle stabil bleiben.

Um dies zu klären, wurden die bei 4°C isolierten $p\gamma$ -Komponenten aus Inkubationen in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl, welche in tripelhelikaler Form vorliegen sollten, bei verschiedenen Temperaturen zwischen 4°C und 25°C mit Pepsin behandelt. In Abb. 21 ist der chromatographierbare Anteil der α -Ketten nach den Pepsinbehandlungen wiedergegeben. Als

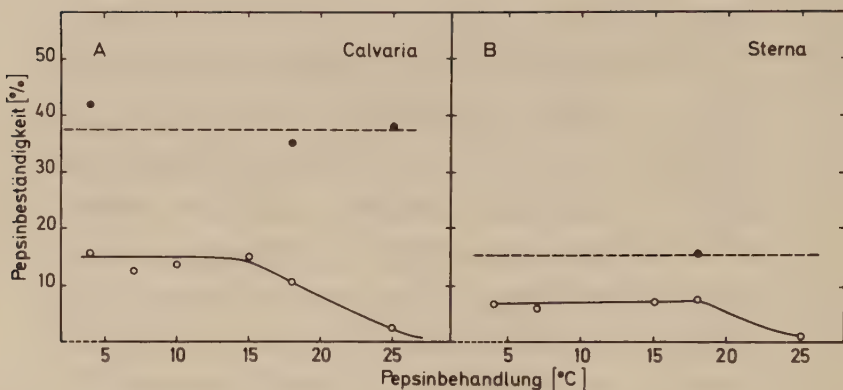


Abbildung 21:

Chromatographierbarer Anteil der Gewebeextrakte nach Pepsinbehandlung bei verschiedenen Temperaturen. 100% = Gesamtradioaktivität ($[^3\text{H}]$ -Pro) vor der Pepsinbehandlung.

(A) Calvariaextrakt, (B) Sternaextrakt;

--- : Inkubation in Abwesenheit von α, α' -Dipyridyl,

— : Inkubation in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl.

Bezug (=100%) wurde die gesamte Radioaktivität vor der Pepsinbehandlung eingesetzt, welche neben Kollagen noch andere Proteine umfaßt.

Das unter Standardbedingungen synthetisierte vollhydroxylierte Kollagen besaß zwischen 4 und 25°C gleichbleibende Stabilität (s. Abb. 21, ---). Das unhydroxylierte Kollagen war viel weniger pepsinresistent. Innerhalb des selben Temperaturbereiches von 4-25°C konnte eine deutliche Abnahme seiner Stabilität gegen höhere Temperaturen hin beobachtet

werden (s.Abb.21, ———). Im Fall der Sterna (s.Abb.21,B) kann außerdem erkannt werden, daß hier der Kollagenanteil an der Gesamtproteinsynthese geringer ist. Das Denaturierungsverhalten des Typ II Kollagens zeigt aber den gleichen Verlauf wie das Typ I Kollagen aus Calvaria.

In einem weiteren Versuch wurde der Anteil der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Ketten am pepsinstabilen Kollagen durch CMC-Chromatographie ermittelt (s.Abb.22). Die Kontrolle zeigte ein exaktes 2:1-Verhältnis der $\alpha 1$ - zu den $\alpha 2$ -Ketten, nämlich 25% zu 12,5% der vor der Pepsinbehandlung radioaktiven Proteine (s.Abb.22,A, — — —). Dagegen zeichnete sich ab, daß Kollagen, welches in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl synthetisiert worden war, nach Pepsinbehandlung bei 18°C keine $\alpha 2$ -Ketten enthielt. Nach Pepsinbehandlung unter 15°C ist das Verhältnis der $\alpha 1$ - zu den $\alpha 2$ -Ketten etwa 4:1, 12% der markierten Proteine waren pepsinstabile $\alpha 1$ -Ketten und nur 3% $\alpha 2$ -Ketten (s.Abb.22,A, ———).

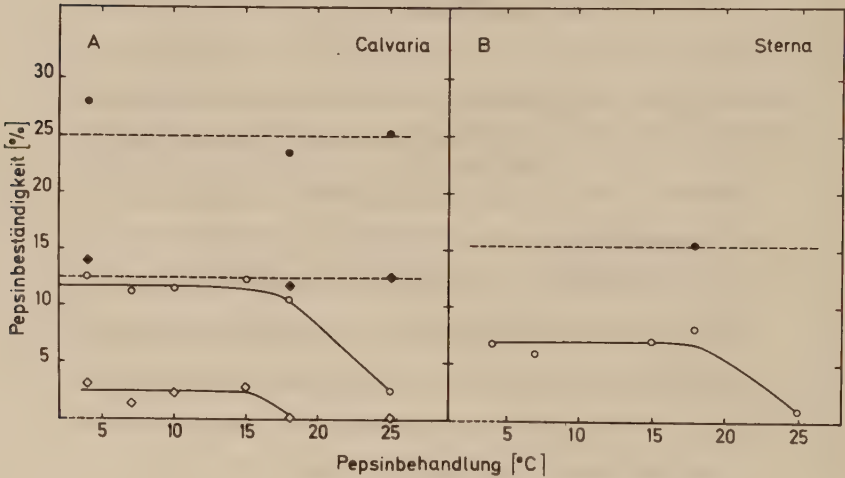
Um das Denaturierungsverhalten und die Pepsinstabilität der $\alpha 1(I)$ -, $\alpha 2$ - und $\alpha 1(II)$ -Ketten unabhängig von den nichtkollagenen Proteinen besser miteinander vergleichen zu können, wurde in Abb.23 eine andere Darstellung der bisher er-

Abbildung 22:

An CMC chromatographierbarer Anteil der Gewebeextrakte nach der Pepsinbehandlung bei verschiedenen Temperaturen. 100% = Gesamtradioaktivität ($[^3\text{H}]$ -Pro) vor der Pepsinbehandlung;

(A) Calvariaextrakt; (B) Sternaextrakt;

- α 1-Ketten, nach Inkubation in Abwesenheit von α, α' -Dipyridyl;
- ◆—◆—◆ α 2-Ketten, nach Inkubation in Abwesenheit von α, α' -Dipyridyl;
- α 1-Ketten, nach Inkubation in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl;
- ◇—◇—◇ α 2-Ketten, nach Inkubation in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl.



haltenen Ergebnisse gewählt. Als Bezugspunkt (=100%) wurde die Ausbeute der α 1(I)-, α 2- bzw. α 1(II)-Ketten aus den Kontrollen nach der Pepsinbehandlung genommen.

Man erkennt in dieser Darstellung deutlich, daß die $\alpha 2$ -Ket-
ten auch bei tiefer Temperatur in sehr viel größerem Um-
fang durch Pepsin zerstört werden als die $\alpha 1$ -Ket-
ten. Während nach Pepsinbehandlung bei tiefer Temperatur die unhydroxy-
lierten $\alpha 1$ -Ket-ten den halben Wert der $\alpha 1$ -Ket-ten des hydroxy-
lierten Zustands erreichen, stellen die unhydroxylierten
 $\alpha 2$ -Ket-ten nur ein fünftel der Menge der hydroxylierten
 $\alpha 2$ -Ket-ten aus der Kontrolle.

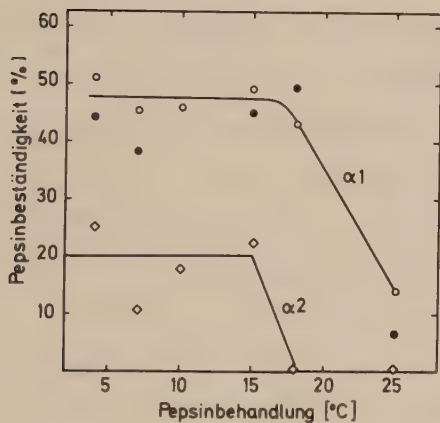


Abbildung 23:

- $\alpha 1$ (I) aus Calvaria, in Anwesenheit von 1.4 mM α, α' -Dipyridyl synthetisiert;
 - $\alpha 1$ (II) aus Sterna, in Anwesenheit von 0.5 mM α, α' -Dipyridyl synthetisiert;
 - ◇ $\alpha 2$ aus Calvaria, in Anwesenheit von 1.4 mM α, α' -Dipyridyl synthetisiert;
- 100% jeweils entsprechende α -Kette, in Abwesenheit von α, α' -Dipyridyl synthetisiert.

Die in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl inkubierten Gewebeextrakte wurden bei verschiedenen Temperaturen mit Pepsin behandelt und anschließend an CMC aufgetrennt. Die pepsinresistenten, chromatographierbaren α -Ket-ten wurden bezogen auf die in Abwesenheit von α, α' -Dipyridyl synthetisierten, pepsinresistenten und chromatographierbaren α -Ket-ten des jeweiligen Typs (=100%).

Eine weitere interessante Feststellung aus Abb.23 ist die Tatsache, daß die $\alpha 1(\text{I})$ -Ketten aus *Calvaria* (o) und die $\alpha 1(\text{II})$ -Ketten aus *Sterna* (●) neben einer gleichen Denaturierungstemperatur zwischen 18 und 25°C auch die gleiche Pepsinbeständigkeit von etwa 50% unter 15°C aufwiesen.

Eine kurze Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse dieses Abschnittes ist auf S. 78 in Punkt 4 gegeben.

3.5. GLYCOSYLIERUNG

Im Rahmen dieser Untersuchungen sollte auch die der Hydroxylierung folgende Glycosylierung experimentell angangen werden. In einem ersten Versuch wurde [^3H]-Gal zur Markierung verwendet. Da das Gewebe aber anscheinend einen zu hohen Vorrat an Kohohydraten besaß, konnte keine [^3H]-Gal-Aufnahme beobachtet werden. Daher wurde eine Zuckerverarmung angestrebt (Experiment A).

Um diesen Mangelzustand zu erreichen (Inkubationsphase I), wurden die Gewebe einige Stunden in hexosefreiem Medium oder in Anwesenheit von Cytochalasin B vorinkubiert. Dieses inhibiert die Aufnahme von Hexosen reversibel⁽⁵⁷⁾. Während dieser Inkubationsphase I wurde das bei Zuckermangel synthetisierte Kollagen mit [^{14}C]-Gly oder [^{14}C]-Pro markiert (s.Abb.24,I,A). Im Anschluß daran sollte in einer Inkubationsphase II bei Blockierung der Proteinsynthese durch Puro-mycin der Einbau von [^3H]-Gal in das unterglycosylierte Kollagen erfolgen (s.Abb.24,II,A).

Die aus solchen Inkubationen gewonnenen und an Agarose Ag.1.5 in 1 M CaCl_2 chromatographierten α -Ketten, welche mit [^{14}C]-Aminosäuren markiert waren, trugen jedoch keine [^3H]-Markierung (s.Abb.24,II A). Diese eluierte hauptsächlich mit höheren Poly-

meren (s. Abb. 24, II A, -x-x-x-) sowie im Bereich niedrigen Molekulargewichts (nicht gezeigt).

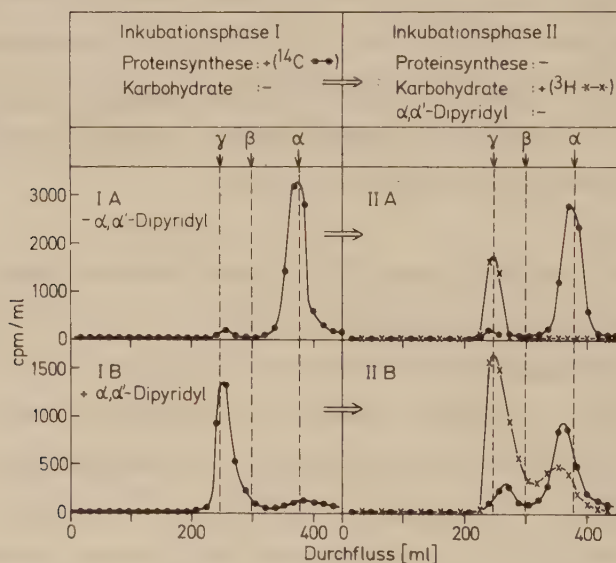


Abbildung 24:

Agarose Ag 1.5-Chromatographie unter denaturierenden Bedingungen.

- I Inkubation mit $[^{14}\text{C}]$ -Gly und $[^{14}\text{C}]$ -Pro (—●—●—●) bei gleichzeitiger Zuckerverarmung im Medium oder Anwesenheit von Cytochalasin B;
 II Inkubation mit $[^3\text{H}]$ -Gal (-x-x-x-) bei gleichzeitiger Anwesenheit von Puramycin;

- (A) Experiment immer in Abwesenheit von α, α' -Dipyridyl;
 (B) Experiment während Phase I in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl, danach in Phase II in Abwesenheit von α, α' -Dipyridyl.

Es wurde daher vermutet, daß Galaktose trotz des Hexosemangels bereits während der Synthese eingebaut worden war (zumal nur vier Galaktosereste auf eine $\alpha 1(I)$ -Kette übertragen werden müssen). Um eine Glycosylierung während der Inkubationsphase I vollständig auszuschließen, wurde in einem weiteren Versuch (Experiment B) durch die Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl die Hydroxylierung als Voraussetzung der Glycosylierung inhibiert. In der anschließenden Inkubationsphase II wurde dann unter Ausschluß von α, α' -Dipyridyl (wie bei *Chase*) das Kollagen hydroxyliert und mit $[^3\text{H}]$ -Gal glycosyliert.

Wie die Chromatographie an Agarose Ag 1.5 zeigt (s. Abb. 24, II B, -x-x-x-) enthielten die α -Ketten tatsächlich $[^3\text{H}]$ -Gal. Dagegen wurde keine $[^3\text{H}]$ -Gal-Markierung im Bereich der abgespaltenen und aus dem Medium isolierbaren Prokollagenpeptide gefunden. Aufgrund der unter diesen Versuchsbedingungen geringen Einbaurate von $[^3\text{H}]$ -Gal in die Kollagenketten wurden keine weiteren Experimente durchgeführt.

Die mit $[^3\text{H}]$ -Gal markierten höheren Polymere waren in Calvaria- und Sternainkubationen unabhängig von der Anwesenheit von Puromycin nur entsprechend der Dauer der Inkubationsphase II (s. Abb. 24, II A und II B, -x-x-x-) enthalten. In der Gel-Elektrophorese in SDS wurde für sie ein höheres Molekulargewicht als für die γ -Komponenten des Kollagens ermittelt.

Die Sekretionsrate dieser kohlehydrathaltigen Substanzen lag über jener, wie sie nach Markierung mit Aminosäuren gefunden wurde: Über 8% der mit $[^3\text{H}]$ -Gal markierten nicht dialysablen Produkte konnten im Sternamedium gefunden werden, gegenüber nur 3% der mit Prolin markierten (s.3.6.). Wurde zur Zuckerverarmung (=Inkubationsphase I) Cytochalasin B eingesetzt, so fanden sich in der Inkubationsphase II nach den ersten 20 Min. sogar 20-50% der mit $[^3\text{H}]$ -Gal markierten Produkte im Kulturmedium der Sterna. Unabhängig davon blieb die Sekretionsrate der Proteine konstant; im Kulturmedium traten gleichzeitig etwa 3% der mit Aminosäuren markierten Produkte auf.

Eine kurze Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse dieses Abschnittes ist auf S. 78 in Punkt 5 gegeben.

3.6. SEKRETION

Untersuchungen von PROCKOP und anderen Autoren an isolierten Fibroblasten aus embryonalen Hühnersehnen haben gezeigt, daß durch die Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl in diesem System die Abgabe von Kollagen aus den Zellen ins Kulturmedium, d.h. die Sekretion, stark verzögert wird ⁽¹⁷⁾. Dies konnte jedoch in unserem System, in dem die Zellen innerhalb ihrer ursprünglichen Matrix eingebettet blieben, nicht bestätigt werden. Die Versuchsanordnungen sind jedoch nicht unbedingt miteinander vergleichbar, da die Abgabe von Syntheseprodukten aus

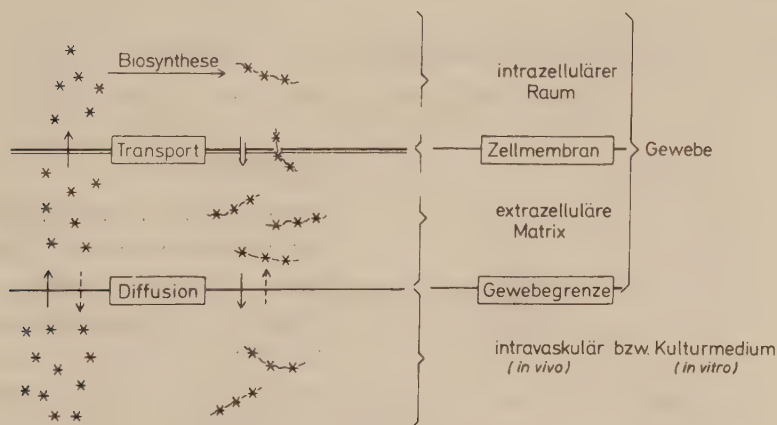


Abbildung 25:

Schema der Verteilung radioaktiv markierter Substanzen (*) in Organkultur auf den intra- und extrazellulären Raum des Gewebes und auf das Kulturmedium.

den isolierten Zellen an das Medium direkt gemessen werden kann, während in der Organkultur (s. Abb. 25) die Produkte von den Zellen zuerst in die extrazelluläre Matrix abgegeben werden und von dort in das Medium diffundieren. Der Prozeß der Sekretion kann durch die zwischengeschaltete Matrix jedoch nur verzögert, nicht aber beschleunigt werden. Da die physikalischen Eigenschaften der Matrix weitgehend konstant bleiben, bleiben die Diffusionseigenschaften unabhängig von den Inkubationsbedingungen gleich und daher müssen Unterschiede in der Verteilung der markierten Proteine aus Gewebe und Medium auf veränderte Transportbedingungen zurückgeführt werden.

In Konzentrationsabhängigkeit trat in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl ein größerer Proteinanteil im Medium auf

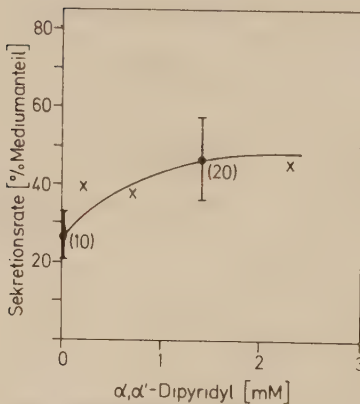


Abbildung 26:

Sekretionsrate in Abhängigkeit von der Konzentration α, α' -Dipyridyl während der Inkubation. Es wurden nur Inkubationen über 6 h mit 250 μCi [^3H]-Pro / 25 Paar *Calvaria* in jeweils 20 ml Medium berücksichtigt.

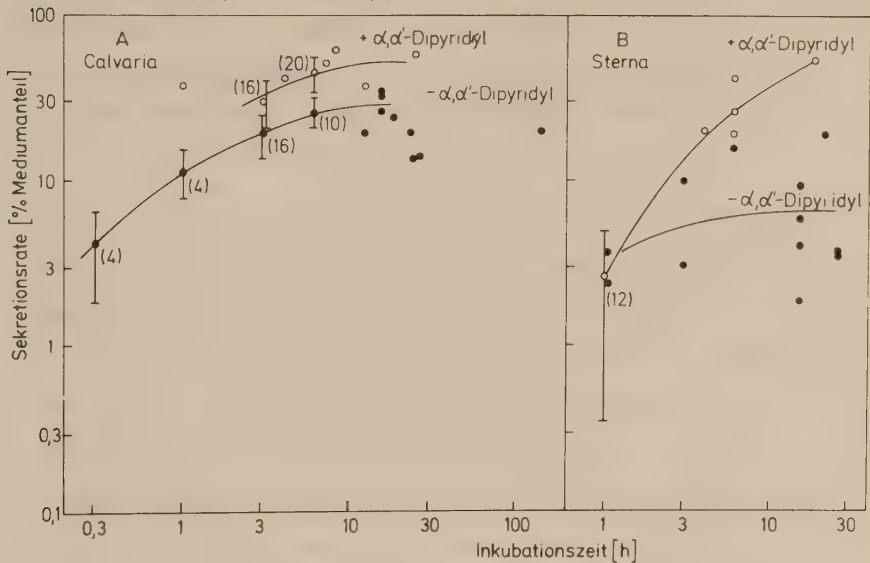
Abbildung 27: Sekretionsrate in Abhängigkeit der Inkubationszeit.

Als Sekretionsrate wurde der aus dem Medium isolierbare Anteil der Gesamtinkorporation (=100%) radioaktiver Substanz in nicht dialysierbare Proteine bezeichnet. Es wurde eine doppelt-logarithmische Darstellung gewählt, um die bei unterschiedlichen Inkubationszeiten gewonnenen Ergebnisse übersichtlich wiederzugeben.

(A) Inkubation von *Calvaria* mit $[^3\text{H}]$ -Pro;

(B) Inkubation von *Sterna* mit $[^3\text{H}]$ -Pro;

jeweils in Abwesenheit (●) und Anwesenheit (○) von α, α' -Dipyridyl, 1.4 mM in (A), 0.5 mM in (B).



(s. Abb. 26). Die bei unterschiedlichen Inkubationszeiten ermittelten Sekretionsraten sind in Abb. 27 gezeigt. Der Übersichtlichkeit halber wurde hierbei eine doppelt logarithmische Darstellung gewählt. Die Anwesenheit von α, α' -Di-

pyridyl hatte sowohl in Calvaria als auch in Sterna eine erhebliche Steigerung der Sekretionsrate zur Folge (s. Abb. 26 und 27).

Dabei ist zu beachten, daß aufgrund der stark verminderten Syntheserate trotz der erhöhten Sekretionsrate weniger markierte Proteine im Medium als in den Medien der Kontrollen vorlagen ⁽²²⁾.

Eine kurze Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse dieses Abschnittes ist auf S. 78 in Punkt 6 gegeben.

4. DISKUSSION

Ein weitverbreitetes Phänomen im Syntheseablauf von Proteinen ist die Modifizierung der Peptidketten während oder im Anschluß an die Translation ^(13.23). So wurden Methylierungen, Hydroxylierungen, Phosphorylierungen, Acetylierungen, Thiolierungen und Glycosylierungen einzelner Aminosäurereste bekannt. Außerdem wurde beobachtet, daß offenbar viele Proteine zunächst als Vorstufe synthetisiert werden ^(12.13).

Obgleich im Falle des Kollagens bereits früh bekannt wurde, daß seine Biosynthese eine Reihe posttranslationaler Schritte umfaßt, konnte die physiologische Funktion und der zeitliche Verlauf dieser Modifizierungsreaktionen noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Zu Hilfsmitteln bei der Untersuchung der Biosynthese des Kollagens entwickelten sich einerseits die Beschäftigung mit kongenitalen Bindegewebssyndromen, andererseits die Einführung exogener Faktoren in der Zell- und Organkultur. Ein besonders potenter Inhibitor war der Chelatbildner α, α' -Dipyridyl (s. auch zusammenfassende Darstellung der komplexen Wirkungsweise S.73 ff).

Die Beobachtung, daß die gesamte Syntheserate in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl vermindert ist, war nicht weiter verwunderlich, da ja durch diesen Chelatbildner gleichzeitig auch eine große Anzahl anderer Enzyme inhibiert werden können. In Versuchen wurden daher Bedingungen ausgearbeitet, unter denen zwar die Kollagensynthese reduziert war, die aber gleichzeitig gewährleisteten, daß die postribosomalen Modifikationen wie die Hydroxylierung und die Abspaltung der carboxy-terminalen Prokollagenpeptide vollständig unterblieben.

Die Inhibition der modifizierenden Schritte wurde in einer *Chase*-Phase in Abwesenheit von α, α' -Dipyridyl nicht nur aufgehoben, die unterbliebenen Modifizierungen konnten dann sogar *nachgeholt* werden. Es konnte auch gezeigt werden, daß Lysin im Anschluß an eine *nachvollzogene* Hydroxylierung glycosyliert wird. Eine Glycosylierung der abgespalteten Prokollagenpeptide mit [^3H]-Gal konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Prokollagen

Von ausschlaggebender Bedeutung für die Untersuchungen am Prokollagen war es, ein Syntheseprodukt isolieren zu können, welches während der Aufarbeitung nicht durch die immer anwesen-

den Proteasen abgebaut wurde. Eingehende Versuche dazu haben ergeben, daß proteolytische Aktivitäten nur verhindert werden konnten, wenn unter neutralen Bedingungen in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren extrahiert wurde. Das so gewonnene Prokollagen, welches in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl synthetisiert worden war, enthielt ausschließlich $p\gamma$ -Komponenten, deren Zusammenhalt nur über S-S-Brücken erfolgt war. Diese disulfidverbrückten $p\gamma$ -Komponenten konnten auch kein Aufarbeitungsartefakt darstellen, da die Extraktionen immer in Anwesenheit von Jodacetamid durchgeführt worden waren.

Es konnte klar gezeigt werden, daß die $p\gamma$ -Komponenten eine Vorstufe des Kollagens bildeten, da sie während eines *Chase*-Experiments in α -Ketten übergingen. Auch mittels Pepsinbehandlung konnten die unterhalb 18°C tripelhelikalen $p\gamma$ -Komponenten des unhydroxylierten Prokollagens in α -Ketten übergeführt werden.

Elektronenmikroskopisch konnten die im SLS-Kristallit aggregierten $p\gamma$ -Komponenten identifiziert werden als Prokollagen mit einem zusätzlichen globulären Anteil am Carboxyterminus. Aminoterminal enthielt das in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl synthetisierte Prokollagen dagegen keine Prokollagenpeptide. Damit war gezeigt, daß α, α' -Dipyridyl die Abspaltung der carboxyterminalen Prokollagenpeptide blockiert, während die ami-

noterminalen vollständig entfernt werden. Zusammen mit dem Befund, daß bei der Dermatosparaxie umgekehrt eine unvollständige Abspaltung der aminoterminalen Peptide stattfindet, ist dies ein eindeutiger Hinweis auf das Wirken zumindest zweier unabhängiger Prokollagenpeptidasen.

Die intramolekularen S-S-Bindungen des Prokollagens müssen aus zwei Gründen innerhalb der carboxyterminalen Extension lokalisiert sein. Erstens wurde das carboxyterminal verlängerte Prokollagen, welches in Anwesenheit von α, α -Dipyridyl synthetisiert worden war, als disulfidverbrückte $\gamma\gamma$ -Komponente isoliert, und zweitens sind die aminoterminal verlängerten DS- α -Ketten, welche gleichfalls Cystein enthalten, nicht in der Lage, ebenfalls kovalent gebundene Trimere zu bilden.

Der Ort dieser Disulfidbrücken sollte sich im äußersten Peptiddrittel befinden, da bei limitierter Proteolyse unter sauren Bedingungen hauptsächlich Einzelketten des Prokollagens gefunden wurden, welche ein höheres Molekulargewicht als die α -Ketten besaßen. Außerdem wurden im Verlauf eines Chase-Experiments zuerst kleinere Peptide abgespalten, welche relativ viel Cystein enthielten.

Die kovalente Zusammenlagerung dreier pro α -Ketten im Prokollagen spielt möglicherweise eine entscheidende Rolle für

die Helixbildung. Während die gesamte Kollagensynthese *in vivo* wenige Minuten braucht ^(18,32), renaturiert vollhydroxyliertes Kollagen sehr langsam und unvollständig ⁽⁵³⁻⁵⁵⁾. Demgegenüber kann das disulfidverbrückte Prokollagen besser renaturieren. Anscheinend wird die Registerfindung innerhalb der $\text{p}\gamma$ -Komponenten *in vitro* begünstigt. Man vermutete bereits bald nach Bekanntwerden einer Vorstufe des Kollagens, daß die Prokollagenpeptide eine wichtige Rolle dabei spielen, drei $\text{pro}\alpha$ -Ketten in die richtige Lage zueinander zu bringen ⁽³³⁾.

Kettenauswahl

Eine weitere interessante Eigenschaft des α,α' -Dipyridyl ist sein Effekt auf die Kettenauswahl. Dieser Selektionsprozeß ist erforderlich bei Typ I Kollagen, welches aus zwei $\alpha 1$ -Ketten und einer $\alpha 2$ -Kette aufgebaut ist. Denkbar ist allerdings, daß ein ähnlicher Mechanismus notwenig ist, wenn verschiedene Kollagentypen innerhalb einer Zelle synthetisiert werden ⁽³⁴⁾.

Die Versuche haben gezeigt, daß die geordnet ablaufende Selektion in Anwesenheit von α,α' -Dipyridyl gestört wird und daß sich $\text{p}\gamma$ -Komponenten bilden können, welche aus drei $\text{p}\alpha 1$ - oder drei $\text{p}\alpha 2$ -Ketten bestehen. Durch limitierten Pepsinabbau wurde klar bewiesen, daß es zwei verschiedene $\text{p}\gamma$ -Kompo-

nennten gibt, die sich in ihrer Stabilität und Zusammensetzung unterscheiden. Der Befund, daß diejenigen Trimere, welche nur $\alpha 1(I)$ -Ketten enthielten, eine höhere Denaturierungstemperatur besitzen als Trimere aus $\alpha 2$ -Ketten, stimmt überein mit früheren *in vitro*-Renaturierungsexperimenten an vollhydroxyliertem Kollagen. Dabei wurde nämlich gefunden, daß sich *künstliche* $[a1]_3$ -Moleküle in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften kaum vom nativen $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2$ -Molekül unterscheiden, während $[\alpha 2]_3$ -Moleküle eine wesentlich tiefere Denaturierungstemperatur besaßen ⁽⁵⁴⁾.

Die geringere Ausbeute des unhydroxylierten Prokollagens nach Pepsinbehandlung, verglichen mit den Kontrollen, kann zwei Gründe haben:

Entweder hemmt α, α' -Dipyridyl die Kollagensynthese in weit stärkerem Maß als die Synthese anderer Proteine - oder die nichthydroxylierten $p\gamma$ -Komponenten, die unter physiologischen Bedingungen nicht tripelhelikal vorliegen, bilden *in vitro* bei Abkühlung auf 4°C nur zum Teil intakte Helices.

Daneben ist der Gedanke nicht von der Hand zu weisen, daß die $\alpha 2$ -Ketten unter dem Einfluß von α, α' -Dipyridyl in geringerem Umfang synthetisiert wurden. Auch nach Pepsinbehandlung bei nur 4°C lag das Verhältnis der $\alpha 1$ - zu den $\alpha 2$ -Ketten nicht bei

2:1 sondern bei etwa 4:1. Die infolge limitierter Proteolyse unter sauren Bedingungen freigesetzten Einzelketten des Prokollagens konnten an CMC im Verhältnis von etwa 3:1 gefunden werden. Auch die nach Reduktion freigesetzten $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ - Ketten wurden an der Gel-Elektrophorese im Verhältnis von ungefähr 3:1 aufgetrennt. Wurde jedoch ein *Chase*-Experiment unter Ausschluß einer *de novo*-Proteinsynthese durchgeführt, so konnten Kollagenmoleküle der Zusammensetzung $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2$ isoliert werden. Das Verhältnis der $\alpha 1$ - zu den $\alpha 2$ - Ketten betrug hier 2:1.

Damit gibt es einen ersten Hinweis, daß ein Selektionsprozeß, der für Typ I-Kollagen notwendig ist, enzymatisch gesteuert wird und durch einen Chelatbildner gestört werden kann. Die Struktur der Prokollagenpeptide an der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kette reicht alleine nicht aus, um eine bevorzugte Zusammenlagerung zweier pro $\alpha 1$ - und einer pro $\alpha 2$ -Kette zu gewährleisten. Andererseits kann dieser Mechanismus unter Ausschluß von α, α' -Dipyridyl reaktiviert werden, so daß trotz bereits geschlossener Disulfidbindungen Trimere gleichartiger α -Ketten in Typ I Kollagen wieder umgebaut werden können (*Chase*).

Dieser Befund widerlegt außerdem die Vorstellung von einer monocistronischen Translation des Prokollagens, wonach eine

einzigste Polypeptidkette, bestehend aus zwei pro α 1-Bereichen und einem pro α 2-Bereich, nach Aneinanderlagerung der α -Ketten zweimal gespalten wird ⁽²⁰⁾.

Prokollagenumwandlung.

Das in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl angereicherte Prokollagen konnte in einer anschließenden *Chase*-Inkubation zu Kollagen umgewandelt werden. Während dieser Phase blieb der Gehalt an Prolin und Glycin im Kollagen fast konstant, während der Gehalt an Cystein und Tryptophan stark abnahm. Bei verschiedenen lange durchgeführten *Chase*-Experimenten konnte beobachtet werden, daß sich der Anteil dieser Aminosäuren nicht gleichmäßig verminderte. Anfangs war die Abnahme des Cystein-Anteils ausgeprägter, später überwog die Abnahme des Tryptophan-Anteils. Gleichzeitig tauchten im Medium einer *Chase*-Inkubation abgespaltene Prokollagenpeptide auf. Es wurden zwei Peptidfraktionen mit unterschiedlichem Molekulargewicht beobachtet, welche offensichtlich bei der Abspaltung der carboxyterminalen Prokollagenpeptide während des *Chase* freigesetzt wurden. Da in verschiedenen lange durchgeführten *Chase*-Experimenten zunächst das kleinere Peptid in größerer Menge auftrat und erst später das größere Peptid, ist eine Degradation dieser Fraktionen im Medium unwahrscheinlich. Andererseits ist das größere Peptid auch kein Polymer des

kleineren, da das Tryptophan- / Cystein-Verhältnis in beiden Fraktionen unterschiedlich war. Damit konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß die Abspaltung der carboxyterminalen Prokollagenpeptide in zwei Schritten erfolgt, wobei zunächst ein kleineres Peptid entfernt wird, welches die intramolekularen Disulfidbindungen enthält, und danach die Abtrennung der restlichen Extension.

Die resultierenden Peptide blieben über mehrere Stunden erhalten. Die ebenfalls große Beständigkeit der aminoterminalen Prokollagenpeptide ergab sich bei der Isolierung aus fötaler Kalbshaut ⁽⁵²⁾ und Amnionflüssigkeit ^(26,27) sowie nach immunologischem Nachweis in fötalem Serum ⁽²⁵⁾.

Sekretion

Während an isolierten Fibroblasten die Sekretion durch die Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl anscheinend blockiert ist ⁽¹⁷⁾, konnte dieser Effekt in der Organkultur nicht bestätigt werden. Im Gegenteil ist die Abgabe des Prokollagens ins Medium gegenüber der Kontrolle sogar prozentual erhöht und bleibt über 24 h etwa konstant. Diese unterschiedlichen Beobachtungen mögen auf die verschiedenen Systeme zurückzuführen sein. Jedenfalls scheint weder die Blockierung der Abspaltung carboxyterminaler Prokollagenpeptide, noch eine Unter-

hydroxylierung mit der Sekretion des Kollagens gekoppelt zu sein, wie vermutet worden war.

Auffallend war die sehr geringe Sekretionsrate der Sterna, hier betrug der Anteil der Medienproteine nur etwa 5% gegenüber etwa 25% bei den Calvaria. Das muß nicht bedeuten, daß die Chondrozyten neu synthetisiertes Kollagen in geringerem Umfang an die extrazelluläre Matrix abgeben als die Osteozyten. Das verminderte Auftreten extrazellulärer Proteine im Medium der Sterna deutet auf schlechte Diffusionseigenschaften des Knorpels hin. Die Sekretionsrate blieb nach einer Anlaufphase von etwa 30 Min. im Kontrollsystem mindestens 24 h lang konstant.

Um erkennen zu können, inwiefern die verschiedenen modifizierenden Schritte der Kollagenbiosynthese miteinander gekoppelt sind, müßte auf andere Weise als durch α, α' -Dipyridyl inhibiert werden. Blockierung der Hydroxylierung in sauerstofffreier Atmosphäre und eisenfreiem Medium hatten nicht den erwünschten Erfolg. Erfolgversprechender ist vielleicht der Einbau von Pro-Analoga, welche nicht hydroxyliert werden können^(1,7) oder Inhibition der Peptidylprolylhydroxylase durch andere Substrate⁽⁵⁸⁾. Um die Entstehung von Disulfidbindungen während

der Synthese wirksam zu blockieren, müßten Analoga anstelle von Cystein eingebaut werden. Eine erfolgversprechende Methode wurde 1962 mit der Herstellung einer Ala-t RNA_{Cys} beschrieben⁽⁵⁹⁾.

Abbildung 28 gibt zusammenfassend einen schematischen Überblick über den vielschichtigen Einfluß von α, α' -Dipyridyl auf Typ I Kollagen. Während in der oberen Bildhälfte die Abläufe der Modifikationsschritte dargestellt sind, gibt der untere Teil die Folgen der Bearbeitung wieder.

In Abwesenheit von α, α' -Dipyridyl (linke Hälfte) werden die pro α -Ketten hydroxyliert und in korrekter Weise ausgewählt ins Register gebracht, so daß sich tripelhelikales Prokollagen der Form $[\text{pro } \alpha 1(\text{I})]_2 \text{ pro } \alpha 2$ bildet, welches am Carboxyterminus wahrscheinlich disulfidverbrückt ist. Durch die Abspaltung der carboxyterminalen (in zwei Schritten) und der aminoterminalen Prokollagenpeptide entsteht das tripelhelikale Kollagenmolekül $[\alpha 1(\text{I})]_2 \alpha 2$. Dieses wird unverändert extrahiert. Bei Pepsinbehandlungen unter 37°C werden die Prokollagenpeptide zerstört, während das tripelhelikale Kollagenmolekül erhalten bleibt. Durch eine Denaturierung der Tripelhelix (unter 45°C oder 1M CaCl_2) werden die beiden $\alpha 1(\text{I})$ - und die $\alpha 2$ -Kette freigesetzt.

In Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl (rechte Hälfte) entstehen zwei verschiedene Prokollagentypen, zum einen $[p \alpha 1(I)]_3$ und zum anderen $[p \alpha 2]_3$. Während die aminoterminalen Prokollagenpeptide abgespalten werden können, bleiben die carboxyterminalen Extensionen mit ihren Disulfidbindungen erhalten. Da dieses Prokollagen außerdem unhydroxyliert vorliegt, kann es unter physiologischen Bedingungen bei 37°C keine Tripelhelix bilden. Sie formiert sich aber während der Extraktion bei 4°C . Wird eine Pepsinbehandlung bei 18°C durchgeführt, so werden die Prokollagenpeptide und die bei dieser Temperatur denaturiert vorliegenden $[p \alpha 2]_3$ -Moleküle abgebaut, während die $[\alpha 1(I)]_3$ -Tripelhelix erhalten bleibt. Infolge einer Pepsinbehandlung bei 25°C wird alles unhydroxylierte Kollagen wie die übrigen Proteine zerstört. Nach Denaturierung erkennt man im Prokollagen keine $p\alpha$ - oder α -Ketten, sondern disulfidverbrückte $p\gamma$ -Komponenten.

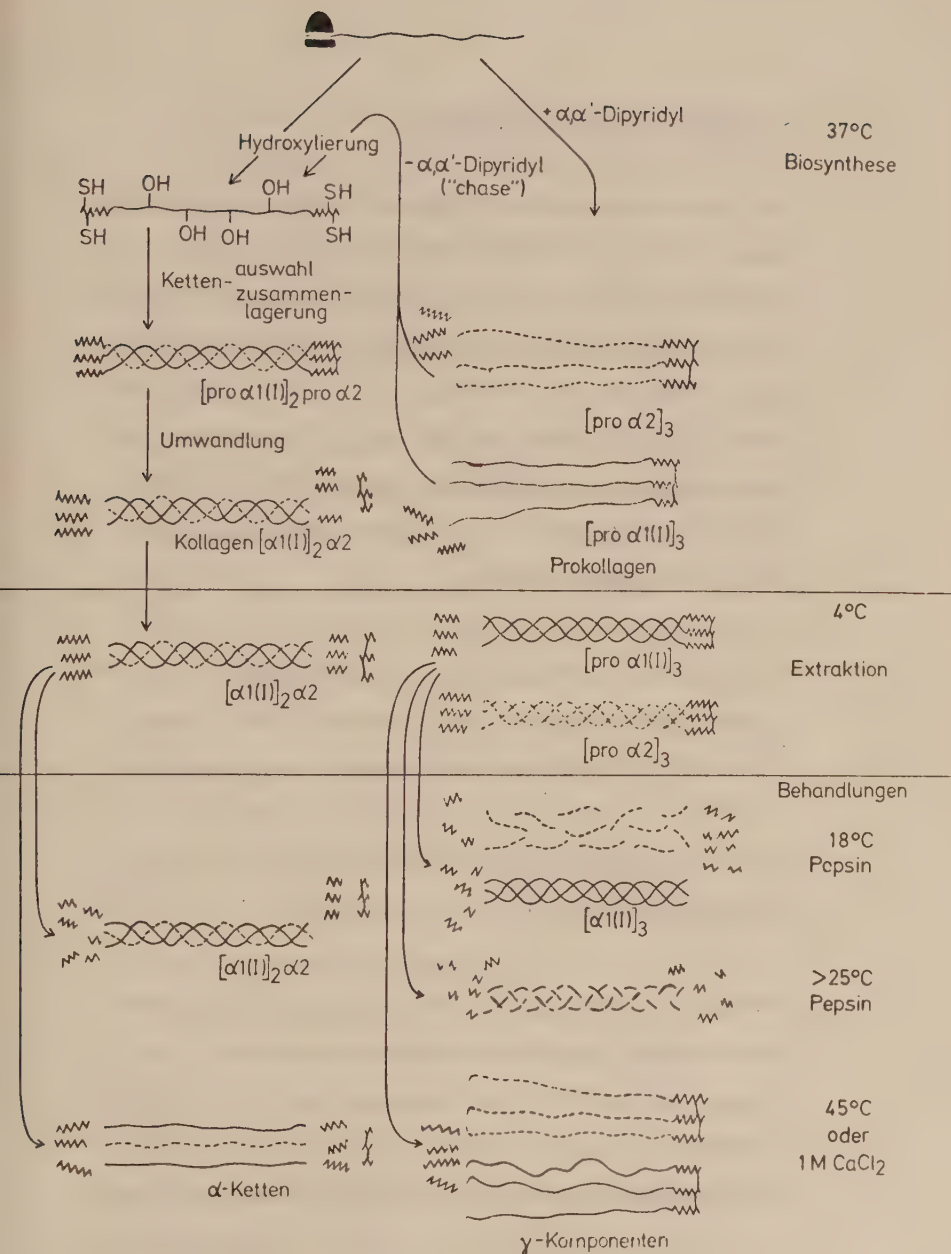
Abbildung 28 (rechte Seite):

Schema der Wirkung von α, α' -Dipyridyl während der Inkubation, der Extraktion bei 4°C , der Pepsinbehandlung bei verschiedenen Temperaturen und der Denaturierung auf Kollagen aus Calvaria.

— $\alpha 1$ -Ketten

- - - $\alpha 2$ -Ketten

√√√ Prokollagenpeptide



5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchung der Biosynthese des Kollagens brachte neue Kenntnisse über die Funktion der Prokollagenpeptide vor der Tripelhelixbildung und über die Umwandlung vom Prokollagen zum Kollagen. Ein wichtiges experimentelles Hilfsmittel bestand in der Verwendung des Inhibitors α, α' -Dipyridyl. Die detaillierte Aufklärung seiner vielfältigen Störauswirkungen auf die Kollagensynthese ermittelten neue Einblicke in den Ablauf dieser Synthesekette. Im einzelnen konnten folgende Teilaufgaben gelöst werden:

- 1) α, α' -Dipyridyl wirkt in höherer Dosierung und während längerer Inkubationszeiten auf die Zellen toxisch: Es inhibiert die Proteinsynthese exponentiell zur Konzentration und zur Dauer seiner Einwirkung. Die Hydroxylierung des kollagengebundenen Prolins wird in *Calvaria* bei 1.4 mM vollständig inhibiert, in *Sterna* bereits bei 0.5 mM.
- 2) Durch die Verwendung neutraler Puffer und Proteaseinhibitoren konnte ein Aufarbeitungsverfahren entwickelt werden, welches proteolytische Degradationen unwahrscheinlich macht. Damit wurde es möglich, das in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl synthetisierte disulfidverbrückte Prokollagen intakt zu extrahieren. Da dieses nur eine carboxyterminale Extension enthielt, konnte eine Reihe bisher unge-

klärter Fragen gelöst werden: α, α' -Dipyridyl inhibiert die Abspaltung der carboxyterminalen Prokollagenpeptide, während es die Umwandlung aminoterminal nicht blockiert. Im Vergleich mit der Dermatosparaxie konnte damit gezeigt werden, daß die Umwandlung zumindest zwei verschiedene Prokollagenpeptidasen erfordert und daß diese unabhängig voneinander in Funktion treten. Des weiteren konnte im Vergleich mit der Dermatosparaxie geklärt werden, daß sich die intramolekularen Disulfidbindungen innerhalb der carboxyterminalen Extension befinden. Sie können sogar im äußeren Drittel vermutet werden, da bei einer *nachvollzogenen* Umwandlung zuerst kleinere cysteinhaltige Peptide neben α -Ketten frei wurden. Damit war aber auch wahrscheinlich gemacht, daß die Abspaltung der carboxyterminalen Extension in zwei Schritten erfolgt.

- 3) Das in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl angereicherte unhydroxylierte Prokollagen, wie auch hydroxyliertes Prokollagen auch Kurzzinkubationen, welche beide über Disulfidbrücken zusammengehalten werden, konnten nach Denaturierung erfolgreicher renaturieren, als Kollagen. Durch das Resultat, daß die Prokollagenpeptide die Registerfindung *in vitro* begünstigen, wird die alte Vermutung experimentell belegt, daß sie während der Synthese als Registrationspeptide agieren.

- 4) Das in Anwesenheit von α, α' -Dipyridyl synthetisierte Prokollagen aus Calvaria trat in zwei verschiedenen γ -Komponenten auf, welche *in vivo* unbekannt sind: $[\text{p}\alpha 1(\text{I})]_3$ und $[\text{p}\alpha 2]_3$. Dies ist ein erster Hinweis auf einen bisher unerkannten Kettenauswahlmechanismus für Typ I Kollagen und damit der erste experimentell begründete Verdacht auf einen enzymatischen Selektionsapparat für die Zusammenführung von Polypeptidketten in der Zelle. Die unhydroxylierten Trimere unterscheiden sich hinsichtlich der Stabilität ihrer Tripelhelix: $[\text{p}\alpha 1(\text{I})]_3$ und $[\text{p}\alpha 1(\text{II})]_3$ denaturierten zwischen 18°C und 25°C , $[\text{p}\alpha 2]_3$ bereits zwischen 15° und 18°C .

- 5) Es konnte gezeigt werden, daß auch die Inhibierung der Lysylhydroxylierung und der Glycosylierung durch α, α' -Dipyridyl reversibel ist und daß beide Modifikationsschritte in Abwesenheit von α, α' -Dipyridyl *nachvollzogen* werden können.

- 6) Das unhydroxylierte Prokollagen wurde relativ schneller sezerniert als das hydroxylierte Kollagen. Dies deutet darauf hin, daß weder die Abspaltung der carboxyterminalen Prokollagenpeptide mit der Sekretion gekoppelt ist, noch die Tripelhelix eine essentielle Voraussetzung für die Ausschleusung aus der Zelle darstellt.

6. MATERIAL UND METHODEN

6.1. MATERIALIEN

Befruchtete und vorbebrütete Eier von der Brüterei Hölzl, Moosburg.

Nährmedien von Bio-Cult, Glasgow: entweder Minimum Essential Medium (Eagle) (BCL-112), ohne L-Glutamin, oder (bei Verwendung anderer markierter Substanzen als Prolin): Eagle's Medium - Dulbecco's Modification (BCL-169), aber ohne D-Glucose, L-Glutamin, Glycin, L-Lysin, L-Tryptophan, L-Tyrosin.

Nicht gesondert aufgeführte Chemikalien von Merck, Darmstadt.
 L-Ascorbinsäure-Natriumsalz von Fluka AG, Buchs (11140). α, α' -Dipyridyl von Schuchardt, München (BI 060), oder von Merck (3098).
 BAPN·HCl (für Organkultur) von Calbiochem, San Diego (16557).
 BAPN-fumarat (für Rattenfutter) von Serva, Heidelberg (13160).
 Penicillin von Hoechst.

Aqua pro injectione von Fresenius (Ampuwa).

L-Cystein-Hydrochlorid·H₂O von Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio.

L-Lysin von Serva (28200).

L-Prolin von Nutritional Biochemicals Corporation.

Actinomycin C von Bayer (Sanamycin).

Actinomycin C₁ = Actinomycin D von Boehringer GmbH, Mannheim
(15531).

Cycloheximid von Boehringer GmbH (15543).

Puromycin von Boehringer GmbH (15637).

Cytochalasin B von Serva (18015).

DTT von Serva (20697) und von Merck (24511).

Unithiol von Heyl, Berlin.

D-Penicillamin (Metalcaptase) von Heyl (408) oder von Serva (31710).

L-Penicillamin von Heyl.

Glutathion von Boehringer (15133).

Glutathionreductase von Boehringer.

s-Äthyl-L-Cystein von Fluka AG (03380).

s-Methyl-L-Cystein von Fluka AG (66560).

Cellit (Partikelgröße 20-45 µ) von Serva (545).

N,N'-Methylenbisacrylamid von Serva (29195).

SDS von Serva (20760).

Coomassieblau, R-250 von Serva (17525).

ATP-Natriumsalz von Serva.

Pepsin (vom Schwein) von Serva (31820).

Szintillationsflüssigkeit von New England Nuclear (Aquasol).

[³⁵ S]-L-Cys	66 m Ci/mmol	von Radio Center Amersham
"	20-60 Ci/mmol	von New England Nuclear (NEG-020)
[¹⁴ C(U)]-Gly	> 90 m Ci/mmol	von " (NEC-276)

[$^{14}\text{C}(\text{U})$]-L-Pro	>225 m Ci/mmol	von New England Nuclear (NEC-285)
[2,3 $^3\text{H}(\text{N})$]-L-Pro	20-40 Ci/mmol	" (NET-323)
[3,4 $^3\text{H}(\text{N})$]-L-Pro	25-50 Ci/mmol	" (NET-090)
[$^3\text{H}(\text{G})$]-L-Try	1-5 Ci/mmol	" (NET-276)
[$^3\text{H}(\text{G})$]-D-Gal	1-5 Ci/mmol	" (NET-311)
[^3H]-Wasser		" (NET-001)

CM-Cellulose microgranular von Whatman (CM-52).

Agarose Ag 1.5 Bio Gel (200-400 mesh) von Bio Rad, Richmond, Californien.

Bio-Gel P-2 (100-200 mesh) von Bio Rad.

Potter-Homogenisator von Braun, Melsungen.

Gewebe-Zerkleinerer von Moulinex, Frankreich (Moulinette).

Zentrifuge von Sorvall (RC2-B) mit Rotor SS 34 max. 18000 UPM

und Rotor GSA max. 12000 UPM = 24000 g.

Ultrazentrifuge von Beckmann Instruments, Pasadena (L2-65B) und

von Spinco (Modell E), mit Rotor 30 max. 30000 UPM = 60000 g.

Spektralphotometer von Beckmann Instruments (DB) mit Durchlauf-

küvette (Absorptionsmessung meist bei 226 nm).

Gefriertrockner von Virtis (MB 200).

Flüssigkeitsszintillationszähler von Beckmann Instruments (LS 250).

Aminosäureanalyser von Bio Cal (Biochrom).

Elektronenmikroskop von Siemens, Berlin (Elmiskop).

Fraktionsteiler von LKB, Schweden (Ultron-Rac).

Schlauchpumpe (für Molekularsieb) von LKB (Perpex 10 200) mit Ge-

triebe 3:100 und Schlauch $\varnothing$ 1.10 mm.

pH-Meter von Orion Research, Cambridge, Mass. (601).

6.2. GEWINNUNG VON RADIOAKTIV MARKIERTEN SYNTHESPRODUKTEN

6.2.1. Inkubation (Abweichungen von den Standardbedingungen s.3.)

150 befruchtete Eier werden 17 Tage in feuchter Atmosphäre bei 37°C bebrütet. Aus jeweils 25 Embryonen werden Calvaria und Sterna freipräpariert und in 50 ml-Erlenmeyer Kölbchen mit 20 ml Nährmedium gehalten. Das Inkubationsmedium enthält zusätzlich 0.1 mg/ml BAPN, 0.05 mg/ml Ascorbat und 400 E/ml Penicillin (gelöst in *Aqua pro injectione*). Zur Stabilisierung des pH bei 7.2 wird mit 5% CO₂, 95% Luft begast. Soll Prokollagen angereichert werden, enthält das Medium außerdem in Äthanol gelöstes α, α' -Dipyridyl: 1.4 mM bei Calvaria, 1 mM bei Sterna.

Nach einer Präinkubation von 20 Min. bei 37°C wird das Inkubationsmedium erneuert und wieder begast. Dann wird mit den markierten Substanzen bei 37°C inkubiert: 250 μCi [³H] / 20 ml bzw. 150 μCi [¹⁴C] / 20 ml bzw. 150 μCi [³⁵S] / 20 ml.

Nach Ablauf der Inkubationszeit (20 Min.-24 h) werden die Medien von den Gewebestücken abgegossen. Sollen die Organe weiterinkubiert werden (*Chase* bzw. Inkubationsphase II, s.3.5.), so werden sie mit dem anschließend verwendeten Inkubationsmedium mehrmals gespült. Dieses enthält 20 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin sowie einen Überschuß (0.05 mg/ml) derjenigen Aminosäuren, welche vorher zur Markierung (*Pulse*) verwendet worden waren.

6.2.2. Aufarbeitung der Gewebeertrakte im Neutralen

Bei Beendigung der Inkubation werden die Organe mehrmals mit kaltem destilliertem Wasser gespült. Dann werden sie mit einem 5 ml-Glaspotter bei 800 UPM, 4°C homogenisiert in 10 ml {1M NaCl, 10 mM EDTA, 50 mM JAc, 0.2 µM Phenylmethansulfonylfluorid, 0.1 µM 4-(Chromercuri)-benzoat, 50 mM Tris, pH 7.4}. Das Homogenat wird über Nacht bei 4°C gerührt. Nach einer Zentrifugation bei 60 000 g, 90 Min., 4°C wird der Überstand ausgiebig gegen 0.2 M NaCl, 0.05 M Tris, pH 7.4 dialysiert.

6.2.3. Aufarbeitung der Inkubationsmedien im Neutralen

In die abgegossenen und eisgekühlten 20 ml Inkubationsmedien werden 185 mg JAc (=0.05 M), 12 g Ammoniumsulfat (=95%) und 50 µl der Suspension {3 mg/ml Phenylmethansulfonylfluorid und 3 mg/ml 4-(Chromercuri)-benzoat} eingerührt (über Nacht bei 4°C). Die ausgefällten Proteine werden abzentrifugiert bei 25 000 g, 60 Min., 4°C. Der Rückstand wird in 5 ml 0.2 M NaCl, 50 mM Tris, pH 7.4 resuspendiert und gegen den gleichen Puffer ausgiebig dialysiert. Dann werden nicht gelöste Bestandteile bei 60 000 g, 90 Min., 4°C abzentrifugiert.

6.3. GEWINNUNG VON LATHYRITISCHEM RATTENHAUTKOLLAGEN

30 2-3 Wochen alten Ratten wird 3 Wochen Trockenfutter gegeben, über welches BAPN versprüht worden war (25 g BAPN in 50 ml H_2O über 8 kg Futter). Die abgezogenen Rattenfelle werden zerkleinert und in 5 l {1 M NaCl, 0.05 M Tris, 0.01 M EDTA, pH 7.4 } 2 Tage bei 4°C gerührt. Nach einer Zentrifugation bei 24 000 g, 20 Min., 4°C wird der Rückstand nochmals extrahiert. Die beiden Überstände werden nach Zugabe von Cellit über eine Prozelannutsche gegeben. Das Filtrat wird bei einer Endkonzentration von 15% NaCl ausgefällt und bei 24 000 g, 30 Min, 4°C abzentrifugiert. Der Rückstand wird in destilliertem Wasser gelöst und gegen 1 M NaCl, 0.05 M Tris, pH 7.4 bei 4°C dialysiert. Nach einer Filtration über eine Cellitschicht werden 28.6 ml Eisessig/l Filtrat zugegeben und auf 7% NaCl gebracht. Nach einer Zentrifugation bei 24 000 g, 20 Min., 4°C wird der Rückstand in 0.5% Essigsäure gelöst und bei mehrmaligem Pufferwechsel gegen 0.02 M Na_2HPO_4 pH 7.4 dialysiert. Die ausgefallenen Kollagenfibrillen werden bei 24 000 g, 30 Min, 4°C abzentrifugiert und in 0.5% Essigsäure gelöst. Nach ausgiebiger Dialyse gegen 0.1% Essigsäure wird das gereinigte Kollagen gefriergetrocknet.

6.4. CHROMATOGRAPHIE

6.4.1. Chromatographie an CMC

Nach der Methode von PIEZ *et al.* ⁽⁸⁾ in der Modifikation von PONTZ *et al.* ⁽²²⁾ wird an CM-Cellulose unter denaturierenden Bedingungen chromatographiert in {1 M Harnstoff, 0.02 M Kaliumazetat, pH 4.8} bei 44°C. Vor Auftrag wird die Probe 20 Min. bei 45°C denaturiert. Bei einem Säulenvolumen von 1.5×10 cm geht der lineare Gradient (0-0.11 M LiCl) über 800 ml Puffer. Die Durchflußgeschwindigkeit beträgt 180-200 ml/h. Zur Messung der Radioaktivität werden den Fraktionen (Fraktionierungszeit 3.5 Min.) jeweils 1.0 ml entnommen und mit 10 ml Aquasol vermischt.

6.4.2. Chromatographie an Agarose Ag 1.5

In einer Säule von 2.5×150 cm wird bei Raumtemperatur absteigend in {1 M CaCl_2 , 50 mM Tris, pH 7.4} chromatographiert. Es wird eine Durchflußgeschwindigkeit von 22-24 ml/h gewählt. Aus den Fraktionen (Fraktionierungszeit 20 Min.) werden 0.5 ml entnommen und mit 0.5 ml H_2O und 10 ml Aquasol vermischt.

6.5. GEL-ELEKTROPHORESE IN SDS

Gele: Es werden 5%-Gele (7.0 cm lang) aus 1:1 Mischung der Lösung A und B hergestellt und nach Überschichten mit H_2O über Nacht poly-

merisiert.

100 ml Lösung A: 10 g Acrylamid, 0.26 g Bis, 50 ml Natriumhydrogenphosphat, 10 ml 2% SDS, 0.1 ml Temed, pH 7.2.

100 ml Lösung B: 0.15 g Persulfat, 50 ml 0.2 M Natriumhydrogenphosphat, pH 7.2.

Probenauftrag: Die Proben werden in { 0.1 M NaH_2PO_4 , 1% SDS, 8 M Harnstoff, 0.01% Bromphenolblau, pH 7.2 } gelöst und gut verschlossen 20 Min. bei 45°C denaturiert. Zur Reduktion werden vorher 2-5% Mercaptoäthanol zugegeben. Jeweils maximal 0.5 mg Protein (anfärbbare Banden bereits mit 50 µg) mit mindestens 10 000 CPM [^{14}C] oder 20 000 CPM [^3H] werden in 50 λ (maximal in 150 λ) auf ein Gel aufgetragen. Nach dem Probeauftrag wird mit dem Elektrophoresepuffer überschichtet.

Elektrophorese: Stromstärke zunächst 20 Min. 4 mA/Gel, dann 3-6 h 6-10 mA/Gel.

500 ml Elektrophoresepuffer: 250 ml 0.2 M Natriumhydrogenphosphat, 25 ml 2% SDS, pH 7.2.

Färben: Die Unterseite der Gele wird mit Tusche markiert. Anschließend wird 3 h mit Coomassieblaulösung angefärbt und dann über Nacht in 7.4% Essigsäure entfärbt.

Coomassieblaulösung: 1.25g Coomassieblau, 454 ml 50% Methanol, 46 ml Eisessig.

Radioaktivitätsmessung: Die Banden werden mit Tusche markiert. Dann werden die Gele mit pulverisiertem Trockeneis gefroren und in 0.8-1.0 mm dicke Scheiben geschnitten. Die Scheibchen werden mit jeweils 0.5 ml 30% H_2O_2 in verschlossenen Countinggläschen (Parafilm) bei Raumtemperatur über 2 Tage hydrolysiert. Das Hydrolysat wird mit jeweils 10 ml Aquasol vermischt und vor der Szintillationsmessung weitere 2 Tage bei Raumtemperatur gelagert, um die Chemoillumineszenz abklingen zu lassen (einfachere Methode ⁶⁰).

6.6. BESTIMMUNG DES HYDROXYLIERUNGSGRADES

6.6.1. *Peptidylprolylhydroxylase-Test* ⁽⁴⁾

Enzymanreicherung: 8 g Haut neugeborener Ratten werden mit Extraktionspuffer homogenisiert. Der Extrakt wird bei 18 000 g, 30 Min., 4°C zentrifugiert und der Überstand über Glaswolle gegeben. Das Filtrat wird nochmals zentrifugiert bei 24 000 g, 1 h, 4°C und der Überstand gegen 2 l Extraktionspuffer bei 4°C dialysiert. Die Konzentration der Enzymlösung sollte etwa 7.5 mg Protein/ml betragen. Extraktionspuffer: 250 mM Saccharose, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 0.1 mM DTT, 0.01 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 7.4.

In vitro-Hydroxylierung: Die Inkubation des mit $[3,4^3\text{H}]$ -Pro markierten Kollagensubstrates erfolgt in Trispuffer {0.1 M Tris,

pH 7.4 } in einem Gesamtvolumen von 2 ml über 60 Min. bei 37°C.

Ein Ansatz enthält (jeweils in Trispuffer gelöst):

0.5 ml Substrat (etwa 20 000 CPM [3,4 ^3H]-Pro)

0.2 ml 0.05 M Ascorbat

0.2 ml 0.01 M $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$

0.25 ml Rinderalbumin (15 mg/ml)

0.15 ml Katalase (4 mg/ml)

0.2 ml 0.01 M αKGS

0.4 ml Enzymlösung

Jede Probe wird in 3 Parallelansätzen inkubiert, jedoch einmal ohne αKGS , einmal ohne Enzymlösung. Die Inkubation wird beendet, indem 100 λ 50% Trichloressigsäure zugegeben werden.

Messung: Das bei der Hydroxylierung frei gewordene $^3\text{H}_2\text{O}$ wird abdestilliert. 1.5 ml des Destillates werden mit 12.5 ml Aquasol vermischt für die Szintillationsmessung.

6.6.2. Aminosäureanalyse

Die gefriergetrocknete Probe (mindestens 10 000 CPM [2,3 ^3H]-Pro oder [^{14}C]-Pro) wird in 1 ml { 25% HCl_{dest} , 1/20% Mercaptoäthanol } unter N_2 -Atmosphäre über 24 h bei 110°C hydrolysiert. Nach Abziehen der HCl wird die Probe am Aminosäureanalyser aufgetrennt. Das Eluat wird in 3 ml-Fractionen unterteilt und deren Radioaktivität gemessen.

6.7. PEPSINBEHANDLUNG

Die Pepsinbehandlung wird mit einigen Modifikationen nach der Methode von LAYMAN *et al.* ⁽¹⁹⁾ durchgeführt. Zu der Probe (in 0.5 % HAC) werden 25 mg lathyritisches Rattenhautkollagen gegeben und mit 0.1 mg/ml Schweinepepsin für 6 h bei 18°C inkubiert. Dann wird im Eisbad abgekühlt und die Probe mit gesättigter Tris-Lösung auf pH 7.4 gebracht. Nach 20 Min. bei 0°C wird gegen 17.5 % KCl, 0.02 M Na₂HPO₄, pH 7.4 dialysiert, zunächst bei 4°C über Nacht, dann bei Raumtemperatur. Das Präzipitat wird bei 20 000 g, 60 Min., 4°C abzentrifugiert, in 10 ml 0.5 % HAC aufgenommen und gegen den Chromatographiepuffer dialysiert.

6.8. DARSTELLUNG DER SLS IM EM

Nach ausgiebiger Dialyse gegen 0.1% Essigsäure wird die Probe (0.4–0.8 mg/ml) gegen 0.4% ATP-Natriumsalz, pH 2.8 dialysiert. Die Suspension wird auf einen Objektträger gegeben und 12–15 Min. mit 0.5% Phosphowolframsäure, pH 3.5 angefärbt. Nach mehrmaligem Waschen wird 10 Min. mit 1% Uranylazetat nachkontrastiert. Eine negative Anfärbung wird mit 4% Phosphowolframsäure, pH 7.0 über 8–10 Min. erreicht.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Traub, W. and K.A. Piez. 1971. The chemistry and structure of collagen (Review). *Adv. Prot. Chem.* 25: 243-352.
2. Fietzek, P.P. and K. Kühn. 1976. The primary structure of collagen (Review). *Int. Rev. Conn. Tissue.* 7: 1-60.
3. Ramachandran, G.N. (Ed.). 1967. Treatise on Collagen. Academic Press, New York.
4. Hutton, J.J. jr., A. Kaplan, and S. Udenfriend. 1967. Conversion of the amino acid sequence Gly-Pro-Pro in protein to Gly-Pro-Hyp by collagen proline hydroxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 121: 384-391.
5. Fietzek, P.P. and J. Rauterberg. 1975. Cyanogen-bromide peptides of type III collagen. First sequence analysis demonstrates homology with type I collagen. *FEBS Letters.* 49: 365-368.
6. Miller, E.J. 1973. A review of biochemical studies on the genetically distinct collagens of the skeletal system (Review). *Clin. Orthop. Related Res.* 92: 260-280.
7. Miller, E.J. and V.J. Matukas. 1974. Biosynthesis of collagen. The biochemist's view (Review). *Fed. Proc.* 33: 1197-1207.
8. Piez, K.A., E.A. Eigner, and M.S. Lewis. 1963. The chromatographic separation and amino acid composition of the subunits of several collagens. *Biochemistry.* 2: 58-66.
9. Lane, J.M. and E.J. Miller. 1969. Isolation and characterization of the peptides derived from the $\alpha 2$ chain of chick bone collagen after cyanogen bromide cleavage. *Biochemistry.* 8: 2134-2139.

10. Miller,E.J. 1971. Isolation and characterization of a collagen from chick cartilage containing three identical α chains (Review). *Biochemistry*. 10: 1652-1659.
11. Herrmann,H. and K.v.d.Mark. 1975. Isolation and characterization of type III collagen from chick skin. *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* 356: 1605-1612.
12. Kraut,J. 1971. Chymotrypsinogen: X-ray structure (Review). In: The Enzymes. P.D.Boyer (Ed.). Academic Press, New York. 3/3: 165-183.
13. Wetlaufer,D.B. and S.Ristow. 1973. Aquisition of three-dimensional structure of proteins (Review). *Annu.Rev. Biochem.* 42: 135-158.
14. Grant,M.E. and D.J.Prockop. 1972. The biosynthesis of collagen (Review). *New.Engl.J.Med.* 286: 194-199; 242-249; and 291-300.
15. Bornstein,P. 1974. The biosynthesis of collagen (Review). *Annu.Rev.Biochem.* 43: 567-603.
16. Martin,G.R., P.H.Byers, and K.A.Piez. 1975. Procollagen (Review). *Advan.Enzymol.* 42: 167-191.
17. Prockop,D.J., R.A.Berg, K.I.Kivirikko, and J.Uitto. 1976. Intracellular steps in the biosynthesis of collagen (Review). In Druck.
18. Vuust,J. and K.A.Piez. 1972. A kinetic study of collagen biosynthesis. *J.Biol.Chem.* 247: 856-862.
19. Layman,D.L., E.B.McGoodwin, and G.R.Martin. 1971. The nature of the collagen synthesized by cultured human fibroblasts. *Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.* 68: 454-458.
20. Church,R.L., S.E.Pfeiffer, and M.L.Tanzer. 1971. Collagen biosynthesis: Synthesis and secretion of a high molecular weight precursor (procollagen). *Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.* 68: 2638-2642.

21. Kulonen, E. and J. Pikkarainen (Eds.). 1973. Biology of the Fibroblast. Academic Press, London and New York.
22. Pontz, B.F., P.K. Müller, and W.N. Meigel. 1973. A study of the conversion of procollagen. Release and recovery of procollagen peptides in the culture medium. *J. Biol. Chem.* 248: 7558-7564.
23. Uitto, J. and D.J. Prockop. 1973. Rate of helix formation by intracellular procollagen and protocollagen. Evidence for a role for disulfide bonds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55: 904-911.
24. Müller, P.K. and O. Jamhawi. 1974. The biosynthesis of a precursor of cartilage collagen by embryonic chicken sterna in the presence of α, α' -dipyridyl. *Biochim. Biophys. Acta.* 365: 158-168.
25. Dehm, P., B.R. Olsen, and D.J. Prockop. 1974. Antibodies to chick-tendon procollagen. Affinity purification with the isolated disulfate-linked NH_2 -terminal extensions and reactivity with a component in embryonic serum. *Eur. J. Biochem.* 46: 107-116.
26. Lee, G., R. Tate, G. Martin, and L. Kohn. 1975. Purification of a type III procollagen from bovine amniotic fluid and development of a specific antiserum to type III procollagen (Meeting Abst.). *Fed. Proc.* 34: 696.
27. Novack, H., H. Rohde, and R. Timpl. 1976. Isolation of a procollagen peptide from amniotic fluid (techn. note). *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 357: 601-604.
28. Monson, J.M. and P. Bornstein. 1973. Identification of a disulfide-linked procollagen as the biosynthetic precursor of chick bone collagen. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 70: 3521-3525.

29. Byers, P.H., E.M. Click, E. Harper, and P. Bornstein. 1975. Interchain disulfide bonds in procollagen are located in a large nontriple-helical COOH-terminal domain. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 72: 3009-3013.
30. Fessler, L.I., N.P. Morris, and J.H. Fessler. 1975. Procollagen. Biological scission of amino and carboxyl extension peptides. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 72: 4905-4909.
31. Weiss, J.B. 1976. Enzymic degradation of collagen (Review). *Int. Rev. Conn. Tissue.* 7: 101-157.
32. Piez, K.A. 1970. Biosynthesis of the α chains of collagen. *J. Cell. Physiol.* 76: 389-395.
33. Speakman, P.T. 1971. Proposed mechanism for the biological assembly of collagen triple helix. *Nature.* 229: 241-243.
34. Gay, S., G.R. Martin, P.K. Müller, R. Timpl, and K. Kühn. 1976. Simultaneous synthesis of type I and II collagen by fibroblasts in culture. In Druck.
35. Stark, M., A. Lenaers, C. Lapière, and K. Kühn. 1971. Electronmicroscopical studies of procollagen from the skin of dermatosparactic calves. *FEBS Letters.* 18: 225-227.
36. Bailey, A.J. and C.M. Lapière. 1973. Effect of an additional extension of the N-terminus of collagen from dermatosparactic calves on the crosslinking of the collagen fibers. *Eur. J. Biochem.* 34: 91-96.
37. Gallop, P.M. and M.A. Paz. 1975. Posttranslational protein-modifications, with special attention to collagen and elastin (Review). *Phys. Rev.* 55: 418-487.

38. Berg, R.A. and D.J. Prockop. 1973. Purification of [^{14}C] procollagen and its hydroxylation by prolyl-hydroxylase. *Biochemistry*. 12: 3395-3401.
39. Tanzer, M.L. 1973 Cross-linking of collagen: Endogenous aldehydes in collagen react in several ways to form a variety of unique covalent cross-links (Review). *Science*. 180: 561-566.
40. Robins, S.P. and A.J. Bailey. 1975. The chemistry of collagen cross-links. The mechanism of stabilization of reducible intermediate cross-links. *Biochem. J.* 149: 381-385.
41. Sussman, M., J.R. Lichtenstein, T.P. Nigra, G.R. Martin, and V.A. McKusick. 1974. Hydroxylysine-deficient skin in a patient with a form of the Ehlers-Danlos syndrome. *J. Bone Joint Surg.* 56: 1228-1234.
42. Spiro, R.G. and M.J. Spiro. 1972. Studies on the biosynthesis of the hydroxylysine-linked disaccharide unit of basement membranes and collagens. Parts I, II, and III. *J. Biol. Chem.* 246: 4899-4925.
43. Morgan, P.H., H.G. Jacobs, J.P. Segrest, and L.W. Cunningham. 1970. A comparative study of glycopeptides derived from skeletal vertebrate collagens: a possible role of the carbohydrate in fibril formation. *J. Biol. Chem.* 245: 5042-5048.
44. Meigel, W.N. und P.K. Müller. 1975. Kollagenkrankheiten. *Med. Klin.* 70: 1255-1264.
45. Uitto, J. and J.R. Lichtenstein. 1976. Defects in biochemistry of collagen in diseases of connective tissue (Review). *J. Invest. Dermatol.* 66: 59-79.

46. Lichtenstein, J.R., G.R.Martin, L.D.Kohn, P.H.Byers, and V.A.McKusick. 1973. A defect in the conversion of pro-collagen to collagen in a form of the Ehlers-Danlos syndrome. *Science*. 182: 298-300.
47. Sampath, N.A., R.C.Siegel, and G.R.Martin. 1972. On the inhibition of lysyl oxidase by β -aminopropionitrile. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 46: 745-751.
48. Hutton, J.J.jr., A.L.Tappel, and S.Udenfriend. 1966. Requirements for α -ketoglutarate, ferrous iron, and ascorbate by collagen proline hydroxylase. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 24: 179-184.
49. Juva, K., D.J.Prockop, G.W.Cooper, and J.W.Lash. 1966. Hydroxylation of proline and the intracellular accumulation of a polypeptide precursor of collagen. *Science*. 152: 92-94.
50. Barnes, M.J. 1975. Function of ascorbic acid in collagen metabolism (Review). *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 258: 264-277.
51. Müller, P., C.Lemmen, S.Gay, K.v.d-Mark, and K.Kühn. 1974. Biosynthesis of collagen by chondrocytes *in vitro*. Proceedings of the Second International Santa Catalina Island Colloquium "Extracellular Matrix Influences on Gene Expression".
52. Raisch, K. 1976. Isolierung und Charakterisierung biologisch aktiver Substanzen aus fötalem Kalbsgewebe. Diplomarbeit, Universität München.
53. Kühn, K., J.Engel, B.Zimmermann, and W.Graßmann. 1965. Renaturation of soluble collagen. III. Reorganization of native collagen molecules from completely separated units. *Arch.Biochem.* 105: 387-403.

54. Tkocz, C. and K. Kühn. 1969. The formation of triple-helical collagen molecules from $\alpha 1$ or $\alpha 2$ polypeptide chains. *Eur. J. Biochem.* 7: 454-462.
55. Piez, K.A. and M.R. Sherman. 1970. Equilibrium and kinetic studies of the helix-coil transition in $\alpha 1$ -CB2, a small peptide from collagen. *Biochemistry.* 9: 4134-4140.
56. Asconas, B.A. and R.M.F. Parkhouse. 1971. Assembly of immunoglobulin M. Blocked thiol groups of intracellular 7S subunits. *Biochem. J.* 123: 629
57. Kletzien, R.F. and J.F. Perdue. 1973. The inhibition of sugar transport in chick embryo fibroblasts by cytochalasin B. *J. Biol. Chem.* 248: 711-719.
58. Oppenheim, B. and S. England. 1974. Inhibition of prolyl hydroxylase by collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59: 710-717.
59. Chapeville, F., F. Lipman, G.v. Ehrenstein, B. Weisblum, W.J. jr. Ray, and S. Benzer. 1962. On the role of soluble ribonucleic acid in coding for amino acids. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 48: 1086
60. Kobayashi, Y. and D.V. Maudsley. 1974. Biological Applications of Liquid Scintillation Counting. Academic Press, New York: 165

Herrn Professor Dr. K. Kühn
und
Herrn Professor Dr. W. Klingmüller

danke ich herzlich für ihre Unterstützung
und wohlwollende Förderung dieser Arbeit.

Herrn Dr. P. Müller
gilt in besonderem Maße mein Dank
für die Betreuung dieser Arbeit sowie für
wertvolle Anregung und Diskussion.

Frau H. Kadner und Fräulein B. Stüber
bin ich für ihre freundliche und tatkräftige
Mithilfe zu großem Dank verpflichtet.

LEBENS LAUF

Name	Kurt Mario Raisch
geboren	München, 12. April 1947
Eltern	Paula (Dorn) Raisch, (Diplomvolkswirt) Kurt Raisch, (Diplomingenieur)
verheiratet	25. Mai 1973, mit Elfriede Elisabeth Winkler
Volksschule	1953 - 1958, Gebeleschule, München
Gymnasium	1958 - 1963, Altes Realgymnasium 1963 - 1968, Albert Einstein Gymnasium
Studium	1968 - 1976, Biologie, an der Ludwig-Maximilian-Universität in München
Vordiplom	WS 1970/71
Diplomprüfung	WS 1974/75
Diplomarbeit	am Max-Planck-Institut für Biochemie

